

**Heterologe Produktion und Reifung einer löslichen
sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenase aus
Cupriavidus necator in *Escherichia coli***



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Johannes Schiffels
aus Aachen

Marburg/Lahn 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2010 bis Juni 2013 am Fachbereich Chemie und Biotechnologie der Fachhochschule Aachen unter der Leitung von Prof. Dr. Thorsten Selmer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 22.11.2013 angenommen.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Thorsten Selmer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Johann Heider
Drittgutachter:	Prof. Dr. Martin Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2013

Innerhalb des Promotionszeitraums entstanden folgende Originalarbeiten:

Teile der vorliegenden Dissertation sind in folgenden Publikationen enthalten:

Schiffels, J.; Pinkenburg, O.; Schelden, M.; Aboulmaga, el-H. A.; Baumann, M. E. M.; Selmer, T. (2013) An Innovative Cloning Platform Enables Large-Scale Production and Maturation of an Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase from *Cupriavidus necator* in *Escherichia coli*. *PLoS One* **8**(7): e68812.

Schiffels, J.; Baumann, M. E. M.; Selmer, T. (2013) Key Requirements of the [NiFe]-Hydrogenase Maturation Process Revealed By a Cell-free Model System Based on Recombinant Gene Products (in Präparation).

Weitere Originalarbeiten:

Schiffels, J.; Baumann, M. E. M.; Selmer, T. (2011) Facile analysis of short-chain fatty acids as 4-nitrophenyl esters in complex anaerobic fermentation samples by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1218**(34): 5848-5851.

Huck, C.*; **Schiffels, J.***; Herrera, C.N.; Schelden, M.; Selmer, T.; Poghosian, A.; Baumann, M. E. M.; Wagner, P.; Schöning, M. J. (2013) Metabolic responses of *Escherichia coli* upon glucose pulses captured by a capacitive field-effect sensor. *Physica status solidi A* **210**(5): 926-931. (* **Geteilte Erstautorenschaft**)

Aboulmaga, el-H. A.; Pinkenburg, O.; **Schiffels, J.**; El-Refai, A.; Buckel, W.; Selmer, T. (2013) Effect of an Oxygen-Tolerant Bifurcating Butyryl Coenzyme A Dehydrogenase/Electron-Transferring Flavoprotein Complex from *Clostridium difficile* on Butyrate Production in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **195**(16): 3704-3713.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY	XI

I EINLEITUNG 1

I.1 Wasserstoff.....	1
I.1.1 Wasserstoff in der Industrie	1
I.1.2 Wasserstoff in biologischen Systemen	2
I.2 Hydrogenasen.....	3
I.2.1 Biologische Bedeutung und Verbreitung.....	4
I.2.2 Systematische Einteilung.....	5
I.2.2.1 [Fe]-Hydrogenase (Hmd)	5
I.2.2.2 [FeFe]-Hydrogenasen	6
I.2.2.3 [NiFe]-Hydrogenasen	7
I.2.2.3.1 Redoxzustand und O ₂ -Toleranz.....	8
I.2.2.3.2 Einteilung.....	9
I.2.2.3.3 Biosynthese/Reifung.....	12
I.3 [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>Cupriavidus necator</i>.....	14
I.3.1 Das „Knallgas“-Bakterium <i>Cupriavidus necator</i>	14
I.3.2 Wasserstoff-Metabolismus in <i>Cupriavidus necator</i>	15
I.3.3 Die bidirektionale, NAD ⁺ reduzierende Hydrogenase (SH)	18
I.4 Biotechnologisches Potential von Hydrogenasen	20
I.5 Zielsetzung der Arbeit.....	22

II MATERIAL & METHODEN 24

II.1 Material.....	24
II.1.1 Software-, und Internet-Tools.....	24
II.1.2 Chemikalien, Gase und molekularbiologische Reagenzien	24
II.1.3 Primer und Oligonukleotide	24
II.1.4 Bakterienstämme und Basisplasmide	25
II.1.5 Medien	25
II.1.5.1 <i>E. coli</i> Medien	25
II.1.5.2 <i>Cupriavidus necator</i> Medien.....	27
II.1.6 Lösungen und Puffer	28
II.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
II.2.1 Anzucht <i>Escherichia coli</i>	30
II.2.1.1 Genexpression unter P _{Tetracyklin} -Kontrolle	30
II.2.1.2 Genexpression unter P _{T7} -Kontrolle.....	30
II.2.1.2.1 IPTG-Induktion.....	30
II.2.1.2.2 Autoinduktion	31
II.2.1.3 Anzucht im 2 Liter Fermenter	31

II.2.1.4	Anaerobe Anzucht	32
II.2.2	Anzucht <i>Cupriavidus necator</i>	32
II.2.2.1	Anzucht im Schüttelkolben	33
II.2.2.2	Anzucht im 2 Liter Fermenter	33
II.2.3	Bestimmung der Zelldichte und Umrechnungen	33
II.2.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	33
II.3	Molekularbiologische & gentechnische Methoden	33
II.3.1	Isolierung und Reinigung von DNS	33
II.3.2	DNS-Konzentrationsbestimmung	34
II.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	34
II.3.4	Vektorsynthese	35
II.3.4.1	pFXT7-Fusionsvektoren	35
II.3.4.2	Kompatible Expressionsvektoren	35
II.3.5	Genklonierung	36
II.3.5.1	Blunt-Insertion der Amplifikate in pF (linear)	37
II.3.5.2	Transfer/Fusionierung in <i>LguI</i> -in Vektoren	37
II.3.5.3	Subklonierung in <i>Esp3I</i> -in Vektoren	38
II.3.6	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	38
II.3.6.1	Hitzeschock-Transformation	38
II.3.6.2	Transformation mittels TransformAid-Kit	39
II.3.7	Restriktionsverdau zur Plasmid-Kontrolle	39
II.3.8	Agarose-Gelelektrophorese	40
II.3.9	MultiNA-Chipelektrophorese	40
II.3.10	DNS-Sequenzierung	40
II.4	Proteinchemische Methoden	40
II.4.1	Zellaufschluss und Herstellung zellfreier Extrakte	40
II.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
II.4.3	Proteinreinigung	41
II.4.3.1	Reinigung von Hyp-Komplexen	41
II.4.3.2	SH _{rek} -Reinigung mittels Affinitätschromatographie	42
II.4.3.3	SH _{wt} -Reinigung aus <i>Cupriavidus necator</i>	42
II.4.3.4	Konzentrierung gereinigter Proteine	43
II.4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese & Western Blot	43
II.4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
II.4.4.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (N-PAGE)	44
II.4.4.3	2D-Gelelektrophorese	45
II.4.4.4	Coomassie-Färbung von PA-Gelen	46
II.4.4.5	Silber-Färbung von PA-Gelen	46
II.4.4.6	Western Blot	46
II.4.4.6.1	Transfer und Konjugat-Bindung	46
II.4.4.6.2	Detektion	47
II.4.5	SH-Aktivitätsmessung	47
II.4.5.1	H ₂ : NAD ⁺ -Aktivität	47
II.4.5.2	H ₂ : Benzylviologen-Aktivität	47
II.4.5.3	NADH : Ferricyanid Diaphorase-Aktivität	48
II.4.6	Zellfreie Prozessierungstechniken	48
II.4.6.1	Vorbereitung und Herstellung der Extrakte	48
II.4.6.2	Zellfreie Maturation mit Extrakten	48
II.4.7	Analytische Methoden	49
II.4.7.1	Kolorimetrische Eisenbestimmung mit Feren	49
II.4.7.2	UV/Vis Spektroskopie	50

III	ERGEBNISSE.....	51
III.1	Klonierung der <i>Cupriavidus necator</i> Gene.....	51
III.1.1	Auswahl und Klonierung der individuellen <i>Cn</i> Gene.....	51
III.1.2	Design und Assemblierung der Multigen-Konstrukte.....	57
III.1.2.1	Klassische Fusionsstrategie – Assemblierung der <i>Cn</i> Gene zu polycistronischen Operons.....	57
III.1.2.2	Innovative Fusionsstrategie – Assemblierung P _{T7} -kontrollierter Genkassetten.....	59
III.2	Produktion von Wildtyp- und rekombinanten SH Varianten.....	63
III.2.1	Optimierung der SH-Produktion in <i>Cupriavidus necator</i>	63
III.2.2	Kultivierungsbedingungen zur Produktion funktionaler SH in rekombinanten <i>Ec</i> Stämmen.....	65
III.3	Reinigung und Charakterisierung der SH Varianten.....	73
III.3.1	Reinigung der hexameren Wildtyp-SH aus <i>Cn</i>	74
III.3.2	Reinigung der rekombinanten SH Varianten.....	75
III.3.3	Eigenschaften der gereinigten SH Varianten.....	80
III.4	Untersuchungen zum Reifungsprozess der SH.....	83
III.4.1	Isolierung reifungsrelevanter Proteine und Komplexe.....	84
III.4.2	<i>In-vivo</i> -Deletionsexperimente zur Untersuchung der SH-Reifung.....	93
III.4.3	<i>In-vivo</i> -Substitutionsexperimente zur Untersuchung der SH-Reifung.....	97
III.4.4	Entwicklung eines zellfreien <i>in-vitro</i> -Reifungssystems für die SH.....	100
IV	DISKUSSION.....	110
IV.1	Eine kombinatorische, modulare Multigen-Expressionsplattform.....	111
IV.2	Die SH-Produktion in <i>Cupriavidus necator</i> kann systematisch beeinflusst werden.....	116
IV.3	<i>Escherichia coli</i> als Produktionsplattform für [NiFe]-Hydrogenasen.....	119
IV.4	SH-Produktion & Reifung in <i>E. coli</i>: komplexe Einflüsse endo- und exogener Faktoren.....	121
IV.5	Rekombinante SH zeigt die enzymologischen Charakteristika des Wildtyp-Enzyms.....	133
IV.6	Das zellfreie SH-Maturationssystem (ZFM) und seine Anwendbarkeit.....	135
IV.7	<i>In-vivo</i>- und <i>in-vitro</i>-SH-Produktionssysteme zur Untersuchung des Reifungsprozesses.....	136
IV.8	HoxW besitzt ein redoxaktives FeS-Cluster.....	140
IV.9	Fazit und Ausblick.....	143
V	REFERENZEN.....	145
VI	ANHANG.....	167
VI.1	Klonierte <i>Cn</i>-Gene: Sequenzdaten und pE-Klone.....	172
VI.2	Vektorkarten & Verdau zu neu synthetisierten Vektoren.....	190
VI.3	Vektorkarten & Verdau zu Konstrukten für die SH-Produktion.....	192
VI.4	Daten zum Restriktionsverdau von Konstrukten für SH-Reifungsexperimente <i>in vivo</i>.....	195
	DANKSAGUNG.....	198
	ERKLÄRUNG.....	199
	LEBENS LAUF.....	200

Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1 – Strukturen der katalytischen Zentren von [FeFe]- und [NiFe]-Hydrogenasen.	7
Abb. I.2 – Vorgeschlagerener Reifungsweg von [NiFe]-Hydrogenasen am Beispiel der SH aus <i>C. necator</i>	13
Abb. I.3 – Physiologische Funktion der drei [NiFe]-Hydrogenasen aus <i>Cupriavidus necator</i>	17
Abb. I.4 – Struktur der SH aus <i>Cupriavidus necator</i>	19
Abb. II.1 – Gießstation für die Präparation von Gradienten-Nativgelen.	45
Abb. III.1 – Verteilung der Hydrogenase-assoziierten Gene auf dem Megaplasmid pHG1 aus <i>Cn</i>	51
Abb. III.2 – MultiNA-Analyse der PCR-generierten Fragmente am Beispiel der SH-Strukturgen-Fragmente.	54
Abb. III.3 – <i>LguI</i> -generierte Überhänge zur Fusionierung von Genfragmenten am Beispiel des <i>hoxF</i> Gens.	54
Abb. III.4 – Transferschritte zur Generierung von Entry-Klonen aller 21 <i>Cn</i> Gene am Beispiel des <i>hoxF</i> Gens.	55
Abb. III.5 – SDS-PAGE Analyse zum Test der Einzelexpression aller 21 heterologen <i>Cn</i> Gene.	57
Abb. III.6 – SDS-PAGE Analyse zum Test der Expression des <i>hoxFUYH</i> -Polycistrons.	59
Abb. III.7 – Schrittweiser Test der M2-Assemblierung mithilfe des entwickelten pFxT7-Fusionssystems.	60
Abb. III.8 – Vektorkarten & Expressionsanalysen einer Auswahl generierter Multigen-Expressionskonstrukte.	62
Abb. III.9 – Zentrale Schritte zur Optimierung der SH-Produktion in <i>Cn</i> unter heterotrophen Bedingungen.	64
Abb. III.10 – SDS-PAGE Analyse zum Vergleich der T7-basierten Induktionsarten.	67
Abb. III.11 – Auswahl modifizierter Parameter für die Kultivierungsoptimierung rekombinanter <i>Ec</i> Stämme.	68
Abb. III.12 – Einfluss der NiCl_2 -Konzentration im Medium auf die SH-Aktivität ausgewählter Stämme.	69
Abb. III.13 – Wachstumsverlauf von <i>E. coli</i> BL21Star™ (DE3) Stamm „K1A“ im 2 Liter Fermenter.	71
Abb. III.14 – Darstellung des Reinigungsverlaufs nativer hexamerer SH aus <i>Cn</i>	74
Abb. III.15 – Beispiele für Präparationen geringerer Qualität der SH _{Var2} mit potentiellen Fehlerquellen.	76
Abb. III.16 – Nativ- und 2D-PAGE von partiell gereinigten rekombinanten SH Varianten.	77
Abb. III.17 – Darstellung des Reinigungsverlaufs der beiden rekombinanten SH Varianten.	79
Abb. III.18 – Darstellung der drei gereinigten SH Varianten sowie Bestimmung der molekularen Massen.	80
Abb. III.19 – UV/Vis spektroskopische Analyse der rekombinanten SH Variante 2.	81
Abb. III.20 – Darstellung des Reinigungserfolgs einer Auswahl einzelner rekombinanter <i>Cn</i> Proteine.	85
Abb. III.21 – Darstellung einer Auswahl der (partiell) gereinigten <i>Cn</i> Hyp-Komplexe.	87
Abb. III.22 – Darstellung einer Auswahl gereinigter rekombinanter Proteine und Komplexe mittels N-PAGE.	90
Abb. III.23 – Bestimmung der molekularen Massen gereinigter HypC1D1E1- sowie HypA2B2-Komplexe.	91
Abb. III.24 – UV/Vis spektroskopische Analyse von gereinigtem StrepII-HoxW und HypC1//StrepII-HypD1.	92
Abb. III.25 – Aminosäuresequenz von HoxW mit essentiellen und den neu identifizierten Motiven.	93
Abb. III.26 – Vektorkarten der M1- und M2-Deletionsplasmide sowie der Basiskonstrukte pM1 & pM2.	95
Abb. III.27 – Ergebnisse der <i>in-vivo</i> -Deletions-Experimente für die Reifungssätze M1 und M2.	96
Abb. III.28 – Vektorkarten der M1- und M2-Substitutionsplasmide sowie der Basiskonstrukte pM1 & pM2.	98
Abb. III.29 – Gegenüberstellung der Ergebnisse von <i>in-vivo</i> -Deletions- und Substitutions-Experimenten.	100
Abb. III.30 – Untersuchung optimaler Parameter zur zellfreien SH-Maturation mit Extrakten (ZFM).	103
Abb. III.31 – Ergebnisse der Deletions- und Substitutions-Experimente im <i>in-vitro</i> -ZFM-System.	104
Abb. III.32 – Effekte bei Addition von Hyp-Extrakten bzw. gereinigten Hyp-Komplexen im ZFM-System.	106
Abb. III.33 – Experimente zur Isolierung von SH-Komplexen und –Intermediaten aus ZFM-Ansätzen.	108

Abb. IV.1 – Sequenzalignment einer Auswahl von HoxW-Analoga mit wichtigen Motiven.	142
Abb. VI.1–VI.42 – Vektorkarten, MultiNA-Analysen & Sequenzierungen der pE-Einzelgen-Plasmide. ..	172–190
Abb. VI.43 – Vektorkarten der pFxT7-Vektorreihe (neu designte Fusionsvektoren).	191
Abb. VI.44 – Vektorkarten von pAmp.RSF.3a und pSm.CDF.3a (neu designte kompatible Vektoren).	191
Abb. VI.45 – Vektorkarten der SH-Strukturgen-Konstrukte (finale Expressionskonstrukte).	192
Abb. VI.46 – Vektorkarten der pM1- und pM2-Derivate (finale Expressionskonstrukte).	194
Abb. VI.47 – Vektorkarten der mit NAES-Stämmen assoziierten Konstrukte (finale Expressionskonstrukte). ..	194

Tabellenverzeichnis

Tabelle I.1 – Einteilung aller Hydrogenasen inklusive der [NiFe]-Hydrogenasen Untergruppen.	10
Tabelle II.1 – Verwendete Bakterienstämme.	25
Tabelle II.2 – Liste der Originalplasmide.	25
Tabelle II.3 – Ansätze der Haupt-Transferreaktionen für Klonierungsprozeduren in dieser Arbeit	37
Tabelle II.4 – Pipettierschema für die Herstellung eines SDS-PAGE Laufgels.	44
Tabelle II.5 – Pipettierschema für die Herstellung eines SDS-PAGE Kammgels	44
Tabelle II.6 – Pipettierschema für die Herstellung von N-PAGE Lauf- und Kammgelen.	44
Tabelle II.7 – Zusammensetzung der ZFM-Assays	49
Tabelle III.1 – Liste der in dieser Arbeit klonierten Gene, deren Fragmentierung und eingefügte Mutationen....	52
Tabelle III.2 – MultiNA-Analyse von PCR-Amplifikaten am Beispiel der SH-Strukturgen-Fragmente	54
Tabelle III.3 – Liste der in dieser Arbeit produzierten rekombinanten <i>Cn</i> Proteine	56
Tabelle III.4 – Ergebnisübersicht des Bicistron-Screenings für die SH Strukturgene.	59
Tabelle III.5 – Induktionstechniken beim T7-basierten System und Anwendbarkeit auf die <i>Cn</i> Gene.	67
Tabelle III.6 – Auswahl der 10 wichtigsten in dieser Arbeit generierten SH-Produktionsstämme.	72
Tabelle III.7 – Daten zur Reinigung der hexameren Wildtyp-SH aus <i>Cupriavidus necator</i>	75
Tabelle III.8 – Übersicht über Optimierungsschritte zur Reinigung der rekombinanten SH Varianten	78
Tabelle III.9 – Daten zur Reinigung der rekombinanten tetrameren SH Variante 1 aus Stamm „SH1F“	79
Tabelle III.10 – Daten zur Reinigung der rekombinanten hexameren SH Variante 2 aus Stamm „SH2F“.	79
Tabelle III.11 – Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der Wildtyp- und rekombinanten SH- Varianten. ..	83
Tabelle III.12 – Gereinigte rekombinante Reifungs-Proteine und -Komplexe in der Übersicht.	89
Tabelle III.13 – Liste der M1- und M2- <i>in-vivo</i> -Deletions- und Substitutionsstämme inklusive Aktivitäten.	97
Tabelle III.14 – Übersicht zu hergestellten ZFM-Extrakten und deren Einsatzgebieten	102
Tabelle IV.1 – Vgl. bisheriger Arbeiten zur Produktion rekombinanter [NiFe]-Hydrogenasen in <i>E. coli</i>	121
Tabelle VI.1 – Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligos.	167
Tabelle VI.2 – Liste der hergestellten Plasmide und Konstrukte für SH-Produktions- und Reifungsstudien.	169
Tabelle VI.3 – Untersuchung von Redox-Bedingungen und dem Einfluss von O ₂ während der SH-Reinigung.	170
Tabelle VI.4 – Katalytische Eigenschaften verschiedener SH-Proben bzw. –Präparationen.	171
Tabelle VI.5–VI.15 – MultiNA-Daten zu SH-Produktions und Reifungs-Expressionskonstrukten	191–197

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

ad	addieren (auf ein bestimmtes Gesamtvolumen hin)
AH	Aktinobakterielle [NiFe]-Hydrogenase aus <i>Cn</i> (Hyd4-Enzym)
AHT	Anhydrotetrazyklin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ASF	Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
BV	Benzylviologen
Cam ^(R)	Chloramphenicol (-Resistenzgen)
Carb/Amp ^(R)	Carbenicillin/Ampicillin (-Resistenzgen)
CFU	Koloniebildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CMP	hier: Carbamoylphosphat
<i>Cn</i>	<i>Cupriavidus necator</i> H16
DEAE	Diethylaminoethyl (-Sepharose)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribokukleosid-Triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ech	<i>Energy-converting hydrogenase</i> (Gruppe 4 [NiFe]-Hydrogenasen)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPR	Elektronenspinresonanz (<i>electron paramagnetic resonance</i>) Spektrometrie
<i>Esp3I</i> -in/out	Transferreaktionen mit <i>Esp3I</i> -Sequenzen als Donor- (out) oder Akzeptor-Erkennungsstelle (in)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ϵ_x	Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge x in nm [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
Fd _{ox/red}	Ferredoxin (oxidiert/reduziert)
FHL	Formiat-Hydrogen-Lyase (-Komplex)
FMN	Riboflavin-5'-Monophosphat
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometrie
HABA	2-[4'-Hydroxyphenylazo]-Benzoessäure
Hyd-1/2/3/4	<i>E. coli</i> Hydrogenasen 1-4 (Hya, Hyb, Hyc, Hyf)
<i>hyd4</i>	pHG1-Cluster mit M2-Genen (Loci: PHG064–78)

inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan ^(R)	Kanamycin (-Resistenzgen)
K _{AV}	Verteilungskoeffizient bei der Gelfiltration
K _M	Michaelis-Konstante [μ M oder mM]
KPi	Kaliumphosphat (Pufferbasis)
LguI-in/out	Transferreaktionen mit LguI-Sequenzen als Donor- (out) oder Akzeptor-Erkennungsstelle (in)
M1/M2	Maturationssatz 1/2
MBH	Membran gebundene [NiFe]-Hydrogenase (<i>membrane-bound hydrogenase</i>) aus <i>Cn</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mrd.	Milliarden
mRNS	<i>messenger</i> -RNS
Mv	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NFOR	NADH:Ferredoxin-Oxidoreduktase
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x in nm
ORF	<i>Open reading frame</i>
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
pA-	pAmp.RSF.3a-Konstrukte
PA(A)	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pE-	pEntry-Konstrukte
PEG	Polyethylenglykol
PFOR	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
pFXT7	Neu designte Fusionsvektoren (pFnT7-, pFcT7-Vektoren)
pH ₂	Wasserstoff-Partialdruck
pHG1	<i>Cupriavidus necator</i> Megaplasmid (enthält Gene des lithotropen Stoffwechsels)
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
pS-	pSm.CDF.3a-Konstrukte
PSI/II	Photosystem I/II
P _x	Promotor x
RBS	Ribosomale Bindestelle
RH	R egulatorische [NiFe]- H ydrogenase aus <i>Cn</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RR	Resonanz-Raman-Spektroskopie
RT	Raumtemperatur (22–25 °C)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase (<i>soluble hydrogenase</i>) aus <i>Cn</i>
SH _{Var1}	tetramere rekombinante SH Variante 1

SH _{Var2}	hexamere rekombinante SH Variante 2
SH _{Wt}	hexamere Wildtyp-SH aus <i>Cupriavidus necator</i>
(S)LIC	(Sequence and) Ligation-independent cloning
Sm ^(R)	Spectinomycin (-Resistenzgen)
SV	Säulenvolumen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TH	Transhydrogenase (EC Nr. 1.6.1.1)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	transfer-RNS
ü. N.	über Nacht
u. a.	unter anderem
UV/Vis	Ultravioletter und sichtbarer Wellenlängen-Bereich
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vgl./Vgl.	vergleiche mit... / Vergleich
x g	x-fache Erdbeschleunigung (1 g = 9,81 m·s ⁻²)
z. B.	zum Beispiel
ZFM	Zellfreie <i>in-vitro</i> -Maturation

Einheiten und sonstige Berechnungsangaben

°C	Grad Celsius (Temperatur)
µL/mL/L	Volumeneinheiten (Mikro-/Milli-Liter/Liter)
atm/Pa	Druckeinheiten (Atmosphäre/Pascal); 1 atm = 0,1013 MPa = 1,013 bar
bp	Basenpaare (Sequenzlänge)
kb	Kilobasenpaare (Sequenzlänge)
kDa	kilo-Dalton (molekulare Masse)
mA/A	Milliampère/Ampère
mV/V	Millivolt/Volt
ng/µg/mg/g	Masseneinheiten (Nano-/Mikro-/Milli-Gramm/Gramm)
nm/µm	Längen-/Größeneinheiten (Nano-/Mikro-Meter)
nM/µM/mM/M	Stoff-Konzentrationseinheiten (Nano-/Mikro-/Milli-Molar/Molar); 1 M = 1 mol·L ⁻¹
ppm	1:10 ⁶ (<i>parts per million</i>)
s/min/h	Zeiteinheiten (Sekunden/Minuten/Stunden)
U	Unit (Enzymkinetik; 1 U = 1 µmol·min ⁻¹ umgesetztes Substrat)
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v oder v:v	Volumenanteil pro Volumen (als Konzentration oder Verdünnungsverhältnis)
vvm	Volumen pro Volumen pro Minute (Volumenstrom)
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen

Zusammenfassung

Hydrogenasen sind komplexe Metalloenzyme, welche die reversible Spaltung molekularen Wasserstoffs (H_2) in Protonen und Elektronen katalysieren. Enzyme dieser Gruppe sind hinsichtlich ihrer physiologischen Reaktionsrichtung, ihres strukturellen Aufbaus und der Sensitivität gegenüber Sauerstoff äußerst vielfältig. Von besonderer biotechnologischer Relevanz sind O_2 -tolerante Vertreter aus der Untergruppe der [NiFe]-Hydrogenasen, da sie zur aeroben H_2 -Aktivierung befähigt sind. Das „Knallgas“-Bakterium *Cupriavidus necator* (*Cn*) besitzt mindestens drei O_2 -tolerante Hydrogenasen, unter ihnen ein bidirektionales NAD^+ -reduzierendes Enzym, die lösliche Hydrogenase (*Soluble Hydrogenase*, SH). Die katalytischen Eigenschaften der SH ermöglichen potentielle Anwendungen im Bereich enzymbasierter Brennstoffzellen, der Sensorik, der Photosynthese-gekoppelten H_2 -Produktion sowie der Kofaktor-abhängigen Biosynthese *in vivo* und *in vitro*. Die Möglichkeit, Enzyme wie die SH rekombinant produzieren zu können, ist folglich von großem Interesse. Der komplexe Reifungsprozess des [NiFe]-Zentrums, die benötigte Anzahl akzessorischer Gene und der Mangel an gentechnischen Werkzeugen erschwerten bislang vergleichbare Versuche für Enzyme dieser Klasse. Erfolgreiche Arbeiten dokumentierten äußerst geringe Ausbeuten. Ziel dieser Arbeit war die Produktion und Reifung der SH in *Escherichia coli* (*Ec*). Zu diesem Zweck wurde zunächst ein verfügbares Basis-Klonierungssystem (StarGate[®], IBA) erweitert, um den Anforderungen einer Multigen- und Hochausbeute-Expressionsplattform für den Modellorganismus *Escherichia coli* zu entsprechen. Die erste Erweiterung beinhaltete das Design neuer Fusionsvektoren, die jedes Gen unter Kontrolle individueller T7-Promotoren und –Terminatoren stellen und die Verknüpfung jedes Genprodukts mit N- oder C-terminalen StrepII-Tags ermöglichen. Unter Einsatz des neuen Systems wurden insgesamt 21 Hydrogenase-assoziierte *Cn*-Gene, darunter die fünf SH-Strukturgene sowie zwei vollständige Sätze putativer Reifungsgene, systematisch zu funktionalen Multigen-Einheiten (Modulen) assembliert. Die Koexpression von bis zu 10 Genen innerhalb von SH- oder Reifungsmodulen auf einem Plasmid konnte erfolgreich demonstriert werden. Um eine Kombination der SH-Gene mit den Reifungsmodulen in einer Zelle zu ermöglichen, erfolgte anschließend die Entwicklung kompatibler Akzeptorvektoren. Daraufhin konnten Expressionsstämme mit unterschiedlichen Vektor- und Modul-Kombinationen generiert, und damit sowohl SH-Produktions- als auch kombinatorische Studien zum SH-Reifungsprozess ermöglicht werden. SH-Produktionsversuche mit rekombinanten *Ec*-Stämmen deuteten darauf hin, dass die maximale Löslichkeit und Funktionalität der Reifungsproteine nicht nur von der Gendosis und Expressionsrate, sondern auch maßgeblich von einem transienten, wachstumsabhängigen

zellulären Milieu abhängig ist. Aus diesem Grund wurde eine spezielle Kultivierungsstrategie zur SH-Produktion erarbeitet, welche auf einem bekannten Laktose-Autoinduktionssystem basiert. Im Zuge umfangreicher Optimierungsstudien wurden aerobe Langzeit-Kultivierungen mit sequentieller Modifikation der physikalischen Wachstumsparameter und der Medienzusammensetzung vorgenommen. Die Strategie wurde auf die rekombinanten Stämme angewendet und ergab eine einheitliche maximale SH-Aktivität innerhalb der mittstationären Phase 36–40 Stunden nach Inokulation. Maximale spezifische Aktivitäten in Extrakten lagen mit $7,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ in der Größenordnung der Werte, welche bei optimierten Kultivierungen zur Produktion nativer SH in *Cn* erreicht wurden. Die Kombination der vorgestellten Expressionsplattform mit dem erarbeiteten Kultivierungsprozess stellt somit die erste Hochausbeute-Produktionsplattform für eine rekombinante [NiFe]-Hydrogenase dar.

StrepII-getaggte SH-Varianten konnten homogen aus Zellen rekombinanter Stämme isoliert werden. Mit bis zu $227 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ wurde hierbei die höchste bisher für die SH dokumentierte spezifische Aktivität erreicht. In diesen hochreinen Präparationen war die Enzymausbeute verringert, lag jedoch stets im Milligramm-Bereich pro Liter Kultur. Sowohl hinsichtlich der oligomeren Enzymstruktur als auch der katalytischen Eigenschaften entsprachen die rekombinanten Varianten der aus *Cn*-Zellen isolierten Wildtyp-SH.

Durch Entwicklung der kombinatorischen Expressionsplattform wurden innovative Strategien zur Untersuchung des Reifungsprozesses von [NiFe]-Hydrogenasen ermöglicht. Dies wurde anhand der SH als Modellenzym demonstriert. Einzelne Proteine sowie essentielle Reifungs-Intermediate (Komplexe) zweier unabhängiger Reifungsmodule aus *Cn* wurden rekombinant produziert und gereinigt. Dies lieferte Hinweise darauf, dass die Stabilität der einzelnen Reifungsproteine *in vivo* stark von der Ausbildung oligomerer Formen und stöchiometrischer Reifungs-Komplexe abhängt. Durch Reinigung der SH-spezifischen Endopeptidase HoxW konnten darüber hinaus Hinweise auf ein redoxaktives [4Fe-4S]-Cluster mit bislang unbekannten Eigenschaften geliefert werden. *In-vivo*-Deletions- und Substitutionsstudien mit analogen Reifungsproteinen (Hyp) verschiedener Module aus *Cn* und *Ec* lieferten darüber hinaus Erkenntnisse über Spezifitäten und damit die Möglichkeit partieller Komplementation. Durch Entwicklung eines zellfreien *in-vitro*-Reifungssystems für die SH konnten die *in-vivo*-Experimente anschließend entscheidend ergänzt werden. Essentielle Komponenten und limitierende Faktoren des Reifungsprozesses wurden ermittelt. Erste „Pulldown“-Experimente lieferten Hinweise darauf, dass bislang unbekannte Reifungsintermediate durch das *in-vitro*-System identifiziert werden könnten. Dadurch erweist sich die vorgestellte Methodik als potentes grundlagenorientiertes Werkzeug zur Untersuchung des Reifungsprozesses.

Summary

Hydrogenases are complex metalloenzymes, which catalyze the reversible cleavage of molecular hydrogen (H_2) into protons and electrons. Enzymes of this class are found in organisms from all three domains of life and are highly diverse in terms of their structural composition, sensitivity towards oxygen and physiological function. The so-called ‘ O_2 -tolerant’ enzymes belong to the subgroup of [NiFe]-hydrogenases and are attractive candidates for biotechnological applications, since their catalytic cycle proceeds under air. The “Knallgas” bacterium *Cupriavidus necator* (*Cn*) possesses at least three oxygen-tolerant hydrogenases, including a soluble bidirectional NAD^+ -reducing enzyme (SH), the target of this thesis. The catalytic properties of the SH enable potential applications in enzyme-based fuel cells, sensor technologies, H_2 -production coupled to photosynthesis or cofactor-driven biosynthesis *in vivo* as well as *in vitro*. Hence, the possibility to heterologously produce the SH and analogous enzymes is of high interest. However, due to the complex maturation process owned by the enzyme, the corresponding number of accessory genes for assembly of the [NiFe]-centre and a lack of proper genetic tools for multigene co-expression, previous attempts have been of limited success and resulted in extremely low yields.

The aim of this thesis was the production and maturation of the SH in *Escherichia coli* (*Ec*). For this purpose, an available cloning system (StarGate[®], IBA) was initially subjected to an upgrade in order meet the requirements for a multigene and high-yield *Escherichia coli* expression platform. The first development consisted of the design of new fusion vectors, which place each gene under control of individual T7-promoters and –terminators in the course of gene assembly and enable the fusion of each gene product with an N- or C-terminal StrepII-tag. Using the novel fusion system, a total number of 21 hydrogenase-associated *Cn* genes, including five SH-structural genes and two independent sets of auxiliary genes, were systematically assembled yielding functional multigene units (modules). Co-expression of up to 10 genes assembled as SH- or maturation-related modules from one plasmid was successfully demonstrated. In order to combine SH- and accessory modules in one cell, a set of compatible plasmids was designed. Thereby, generation of expression strains harboring different combinations of vectors and modules was enabled. SH-production as well as maturation studies were thus made possible in a systematic and integrative way.

SH-production studies using recombinant *Ec*-strains indicated that the activity of maturation-related proteins was not only dependent on gene doses and the rate of expression, but also on specific cellular environments transiently present during growth. Therefore, a cultivation strategy based on a previously presented lactose-autoinduction system was applied for SH-

production. In the course of optimization studies, aerobic long-term cultivations with sequential modification of both physical growth parameters and the medium composition were carried out. The strategy was subsequently applied to recombinant SH-production strains and consistently yielded maximal SH-activities between 36–40 hours after inoculation. The highest specific activity in cell-free extracts amounted to $7.2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, which is in range of the values achieved with an optimized SH-production process in *Cn*. Hence, combination of the expression platform presented herein with the developed cultivation strategy represents the first high-yield production system for a recombinant [NiFe]-hydrogenase to date.

StrepII-tagged SH-variants were homogeneously isolated from recombinant *Ec* strains. The specific activity of purified recombinant SH reached $227 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, which represents the highest activity for the enzyme reported to date. In case of these ultrapure preparations, yields were reduced but still in the $\text{mg} \cdot (\text{Liter culture})^{-1}$ range. The oligomeric enzyme structures and catalytic properties obtained for the recombinant variants nicely matched the data available for the wildtype-SH isolated from *Cn* cells.

Development of the combinatorial expression platform further enabled innovative strategies to investigate the maturation process of [NiFe]-hydrogenases. This was demonstrated for the SH as a model enzyme in this study. Individual maturation-related proteins as well as complex intermediates of two independent *Cn* maturation sets were recombinantly produced and isolated by StrepTactin affinity chromatography. These results indicated that the *in-vivo*-stability of the maturation factors was largely dependent on the formation of oligomeric conformations as well as stoichiometric complexes with other parts of the maturation machinery. Purification of the SH-specific endopeptidase HoxW revealed the existence of a redox-active [4Fe-4S]-cluster with hitherto unknown properties. This is the first documented isolation of a HoxW-analog and the first indication for an electron-transferring co-factor in a maturation-related specific endopeptidase to date. *In-vivo*-deletion and substitution studies with analogous Hyp-proteins from different *Cn* and *Ec* maturation-related sets provided further insights into specificities and thus, complementation capabilities.

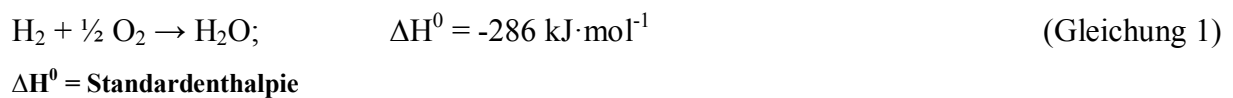
An *in-vitro*-maturation system was developed, which allowed the dissection of the maturation process in a cell-free environment. Essential components and limiting factors of the SH maturation process were determined using this system. Initial pull-down experiments with *in vitro* matured SH suggested that the cell-free system might be used as an efficient technique to identify previously unknown maturation complex-intermediates and to study the general maturation process in detail.

I EINLEITUNG

I.1 Wasserstoff

I.1.1 Wasserstoff in der Industrie

Molekularer Wasserstoff (H_2) gewinnt als Energieträger der Zukunft zunehmend an Bedeutung, resultierend aus der Verknappung fossiler Rohstoffe und der Suche nach klimafreundlichen Alternativen. Unter Normalbedingungen (1 atm; 25 °C) ist H_2 ein Gas. Seine Verbrennung, die sogenannte „Knallgas-Reaktion“, liefert die größtmögliche Energie, wobei lediglich Wasser als Nebenprodukt entsteht (Gleichung 1).



Die sogenannte „Wasserstoffenergiewirtschaft“ stellt einen übergeordneten Begriff für ein mögliches zukünftiges Szenario dar, in welchem H_2 die Rolle des zentralen Energieträgers und Treibstoffs einnimmt [1-3]. H_2 wird derzeit nahezu vollständig in zwei Industriesektoren eingesetzt: So werden etwa 50% im Haber-Bosch Verfahren zur Herstellung von NH_3 , welches wiederum zu großen Teilen in der Düngemittelherstellung eingesetzt wird, benötigt. Der restliche Teil kommt in der Petrochemie zur Prozessierung der in Öl vorhandenen Kohlenwasserstoffe (Hydrocracken, -dealkylierung oder -desulfurierung) und zu geringeren Anteilen zur asymmetrischen Hydrierung (Pharmaindustrie), Kohlehydrierung, als Kühlmittel oder zur Fetthärtung zum Einsatz [2,4].

Derzeit sind im Zuge der „Wasserstoffwirtschaft“ Herausforderungen bezüglich Infrastruktur, Speicherung, Transport oder Verbreitung von peripherer Bedeutung, da als Kernproblem dieses Szenarios die Frage nach der Herkunft des Wasserstoffs verbleibt [5]. H_2 wird derzeit zu über 90% aus fossilen Energieträgern (Öl, Kohle, Erdgas) hergestellt. Verglichen mit der direkten Nutzung der Träger als Brennstoffe bringt diese Energietransformation weder umweltbezogene noch energietechnische Vorteile. Auch die H_2 -Generierung aus Wasser mittels Elektrolyse ist in diesem Kontext kaum relevant, da sie aufgrund des Energieaufwandes derzeit ökonomisch nicht tragbar ist. Darüber hinaus wäre dieses Verfahren auch aus ökologischer Sicht bei theoretisch 100%igem Wirkungsgrad lediglich so klimafreundlich wie der für den Prozess benötigte Strom. Daher steht und fällt eine hypothetische „Wasserstoffwirtschaft“ mit der Möglichkeit, die Energie für H_2 -Generierungsverfahren vollständig aus regenerativen Quellen zu beziehen [5].

I.1.2 Wasserstoff in biologischen Systemen

Wasserstoff als Energiequelle wird als früher Begleiter der Evolution auf der Erde angesehen. Die Ursprünge des Lebens wurden in mannigfaltigen Hypothesen diskutiert (Auswahl: [6-9]). Da die Zusammensetzung der Erdatmosphäre vor etwa 4,1 – 3,8 Mrd. Jahren großer Dynamik unterworfen war und nicht präzise definiert werden kann, bleibt eine direkte Rolle von H_2 in der Formation erster syntropher Konsortien spekulativ [10]. Als gesichert gilt die Anwesenheit eines H_2 -reichen, erdassoziierten „Proto-Gasumschlags“. Der Hauptteil des Wasserstoffs ging jedoch in den Weltraum verloren, da das Gas von der zu schwachen Gravitationskraft der Erde nicht gehalten werden konnte. Aussagen über den atmosphärischen Wasserstoffgehalt zur Zeit der Anfänge des Lebens sind daher schwierig [11,12]. Wasserstoff fungierte jedoch möglicherweise als zentrale Energiequelle früher Lebensformen in der Nähe von hydrothermalen Quellen in der Tiefsee. Dort könnten biotisch¹ oder abiotisch gebildetes CO_2 und H_2 als direkte Substrate für frühe Methanbildner fungiert haben. Diese Unabhängigkeit von Licht wie auch organischem Kohlenstoff, sowie die Nutzung von Wasserstoff als primäre Energiequelle, wird bei frühen Formen des Lebens auf der Erde und darüber hinaus als mögliche Basis für extraterrestrisches Leben diskutiert [13]. Tatsächlich werden derartige Organismen-Assoziationen heute noch in Form von HyperSLiME (*hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem*) in hydrothermalen Tiefseehabitaten gefunden [14].

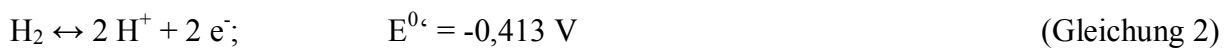
Da die Nutzung von H_2 als Energiequelle sehr früh in der Evolution Einzug hielt, finden sich Organismen, welche diesen verwerten können, in allen drei Domänen des Lebens [15]. Einige Eukaryoten enthalten Hydrogenosomen als Relikte früher endosymbiontischer Ereignisse. Das klassische Modell zur Entstehung der eukaryotischen Zelle, die Endosymbiontentheorie [16], wurde 1998 von zwei unabhängigen Theorien abgelöst bzw. modifiziert. Beide Hypothesen setzen eine syntrophe Abhängigkeit als treibende Kraft für die Entstehung der eukaryotischen Zelle voraus [17,18]. Der Wirt, ein strikt autotrophes Archaeobakterium, war demnach auf Zufuhr der Substrate H_2 und CO_2 angewiesen, ähnlich den heutigen hydrogenotrophen Methanbildnern. Diese Fermentationsprodukte wurden durch den Symbionten, einen Vorgänger heutiger α - [17], bzw. δ -Proteobakterien [18], geliefert. Als Folge einer verminderten Substratverfügbarkeit entstand eine Abhängigkeit des Wirts von den Stoffwechselprodukten des Symbionten, was in zunehmend engerer Assoziation und schließlich in der vollständigen Umschließung desselben resultierte. Gentransfer zwischen Wirt und Symbiont erlaubte schließlich die vollständige Versorgung des Symbionten durch

¹ hier: durch chemosynthetische, Sulfid-abhängige Urbakterien generiert

die Aufnahme- bzw. Transportsysteme des Wirts. Im Gegensatz zur klassischen Endosymbiontentheorie [16] entwickelte sich gemäß der Wasserstoff-Hypothese folglich das Mitochondrium aus diesem Ursymbionten, was einen Paradigmen-Wechsel darstellte [19].

I.2 Hydrogenasen

Die heutige Erdatmosphäre enthält H_2 als Spurengas (0,5 ppm). Sein Verbrauch durch Organismen sowie O_2 -abhängige photochemische Prozesse steht im Gleichgewicht mit der Neubildung durch Mikroorganismen. Der Schlüsselkatalysator, welcher Organismen zur Aktivierung oder Bildung von H_2 befähigt, ist das Enzym Hydrogenase, welches seinen Namen erstmals von Stephenson und Stickland 1931 im Zuge der Untersuchung methanbildender Organismen erhielt [20]. Hydrogenasen katalysieren die Spaltung von H_2 , wodurch je zwei Protonen und Elektronen mobilisiert werden (Gleichung 2).



$E^{0'}$ = Formales Standardredoxpotential (pH 7)

Diese Reaktion ist grundsätzlich reversibel [21,22]. Während man Hydrogenasen *in vitro* meist eine Reaktionsrichtung anhand des Redoxpotentials aufprägen kann, werden diese distinkten Rollen im mikrobiellen Stoffwechsel üblicherweise von unterschiedlichen Enzymen übernommen. Die Nutzung von H_2 als Energiequelle durch Mobilisierung von Elektronen niedrigen Potentials (Aufnahme-Hydrogenasen) steht hierbei der Entsorgung überschüssiger Elektronen (z. B. aus fermentativen Wegen) zur Erhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts gegenüber (Bildungs-Hydrogenasen). Einige Organismen besitzen sowohl Aufnahme- als auch Bildungs-Hydrogenasen und sind somit zur Energie-Rezyklierung befähigt (siehe Abschnitt I.2.1).

Der katalytische Mechanismus dieser Enzyme ist nicht vollständig geklärt. Den bisherigen Modellen ist eine Bindung von H_2 an das Metallzentrum und seine heterolytische Spaltung gemeinsam. Der Elektronentransport erfolgt mittels einer Reihe von Eisen-Schwefel- (FeS-) Clustern zum physiologischen Akzeptor, während die Protonen mittels protonenleitender Aminosäuren an die Proteinoberfläche transportiert werden [23-27].

I.2.1 Biologische Bedeutung und Verbreitung

Die Befähigung, H_2 als Energiequelle zu nutzen, ist eine elementare Voraussetzung für tragende mikrobielle Prozesse auf der Erde. Im Zuge der hydrogenotrophen Methanogenese wird CO_2 schrittweise reduziert, wobei H_2 als Elektronendonator dient [28-31]. Innerhalb der Acetogenese in auf H_2/CO_2 spezialisierten anaeroben Bakterien erfolgt die initiale Reduktion von CO_2 zu Formiat (Methyl-Zweig) mittels aus H_2 oder Fd_{red} stammenden Elektronen [32-34]. Stickstoff fixierende Organismen produzieren H_2 als Nebenprodukt der Nitrogenase, ein Vorgang, der selbst bei N_2 -Mangel stattfindet [35-38]. Mittels Aufnahme-Hydrogenasen erfolgt in diesen Organismen eine teilweise Energie-Rückgewinnung (Rezyklierung), eine O_2 -Entgiftung zum Schutz der Nitrogenase, sowie eine Verminderung der Inhibition letzterer durch das abgeführte Produkt H_2 [39,40]. Der sogenannte *Interspecies-Hydrogen-Transfer* ist ein syntrophes Phänomen, welches Organismen-Konsortien einen Energiestoffwechsel erlaubt, den sie isoliert aufgrund von thermodynamischen Barrieren nicht bewerkstelligen könnten [41-44]. Desweiteren nutzen einige Prokaryoten, als „ H_2 oxidierende Organismen“ zusammengefasst und keine monophyletische Gruppe bildend, Wasserstoff als Energiequelle und übertragen die Elektronen auf SO_4^{2-} , Fe^{3+} , NO_3^- oder O_2 . Die dabei generierten Reduktionsäquivalente können zur Elektronen-Transportphosphorylierung (ATP-Bildung) und/oder in autotrophen Organismen zur CO_2 -Fixierung dienen [45].

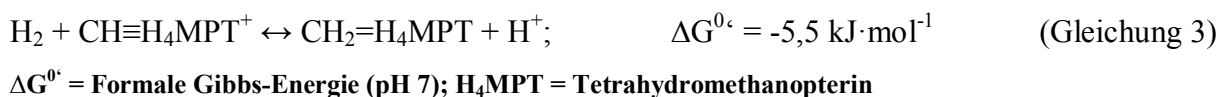
Die Bildung von H_2 in biologischen Ökosystemen kann durch diverse Organismengruppen erfolgen, zu denen auch manche Eukaryoten gehören [46]. Clostridien, obligat anaerobe Bakterien, entsorgen überschüssige Elektronen durch H_2 -Bildung zur Erhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts. Zu diesem Zweck besitzen die Organismen Ferredoxin-abhängige [FeFe]-Hydrogenasen (Abschnitt I.2.2.2), deren Substrat durch die Enzyme PFOR (Pyruvat : Ferredoxin Oxidoreduktase) oder NFOR (NADH : Ferredoxin Oxidoreduktase) geliefert wird [47,48]. H_2 wird darüber hinaus von Cyanobakterien im Falle eines photosynthetisch erzeugten Elektronenüberschusses generiert [49]. Bei den hierbei zugrunde liegenden Mechanismen wird zwischen direkter und indirekter Biophotolyse unterschieden. Dies stellt in photosynthetisch aktiven Organismen eine Erweiterung der oben beschriebenen, Nitrogenase abhängigen, H_2 Produktion dar ([50-52] und Abschnitt I.4). Eine weitere Quelle für biotisch generierten Wasserstoff sind Organismen, welche multimere Gruppe 4 [NiFe]-Hydrogenasen (Ech-Hydrogenasen; Abschnitt I.2.2.3.2) besitzen. Ein Beispiel ist der Formiat-Hydrogen-Lyase (FHL; Hyd-3) Komplex aus *E. coli* [53,54].

I.2.2 Systematische Einteilung

Auf Basis von Sequenzvergleichen und aufgrund der Übereinstimmung mit dem Aufbau des katalytischen Zentrums erfolgt die allgemein anerkannte Einteilung der Hydrogenasen in drei konvergent evolvierte Gruppen [15,55]. Allen Hydrogenasen gemeinsam ist die Anwesenheit eines *low-spin* Fe^{2+} , sowie dessen Koordination durch ungewöhnliche diatomare Liganden, welche sich in keinem anderen biologischen Kofaktor wiederfinden (zwei $\text{C}\equiv\text{O}$ in [Fe]-; je ein bzw. zwei $(\text{C}\equiv\text{N})^-$ und $\text{C}\equiv\text{O}$ pro Eisenatom in [FeFe]- bzw. [NiFe]-Hydrogenasen), im aktiven Zentrum. Bevor diese neuere Systematik durch moderne bioinformatische Erkenntnisse untermauert werden konnte, erfolgte die klassische Einteilung der Hydrogenasen hinsichtlich ihres physiologischen Donators/Akzeptors (z. B. EC-Nr. 1.12.1.2 für NAD^+ ; EC-Nr. 1.12.1.3 für NADP^+ ; EC-Nr. 1.12.2.1 für Cytochrome oder EC-Nr. 1.12.7.2 für Ferredoxin).

I.2.2.1 [Fe]-Hydrogenase (Hmd)

Die ursprünglich als „Eisen-frei“, später als „FeS-Cluster frei“ bezeichnete ***H**₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase* (Hmd oder [Fe]-Hydrogenase) ist ein spezielles, nur in einer Reihe von methanogenen Archaea gefundenes Enzym. Es katalysiert im Zuge der Methanogenese einen Hydrid-Transfer von H_2 zu Methenyl-Tetrahydromethanopterin (Gleichung 3) [56,57] und ersetzt damit die F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase bei Nickel-Limitierung [58,59].



Aufgrund der zwanzigfach höheren H_2 -Affinität der F_{420} -abhängigen Hydrogenase muss der Metabolismus unter Nickel-Limitierung durch eine im Vergleich deutlich höhere Syntheserate der Hmd kompensiert werden [60]. Das Enzym ist als Monocistron kodiert und als Homodimer (je 38 kDa pro Monomer) aktiv [61]. Ein einzigartiger FeGP (Eisen-Guanylylpyridinol) Kofaktor, welcher essentiell für die katalytische Aktivität ist, ist kovalent gebunden [62-65]. Die Hmd ist stark lichtempfindlich [66] und wird durch $\text{C}\equiv\text{O}$ und $(\text{C}\equiv\text{N})^-$ reversibel inhibiert, bleibt jedoch bei Anwesenheit von Sauerstoff aktiv [60,66,67]. Die H_2 -abhängige Reduktion von für [FeFe]-, und [NiFe]-Hydrogenase typischen redoxaktiven Farbstoffen bzw. die Nutzung dieser als Donatoren zur Protonenreduktion wird durch das Enzym nicht katalysiert [28].

I.2.2.2 [FeFe]-Hydrogenasen

[FeFe]-Hydrogenasen finden sich hauptsächlich in anaeroben Bakterien (Clostridien, Sulfat-Reduzierer). Darüber hinaus sind sie jedoch die einzigen Hydrogenasen, die auch in einigen niederen Eukaryoten innerhalb vom Chloroplasten oder Hydrogenosomen gefunden werden (anaerobe Fungi und Ciliaten, Trichomonaden und Grünalgen) [15,48,68,69]. Archaeen besitzen nach jetzigem Kenntnisstand keine [FeFe]-Hydrogenasen. Diese Gruppe von Enzymen ist hauptsächlich als Bildungs-Hydrogenasen bekannt und weist eine einzigartige katalytische Effizienz, sowie Wechselzahlen bis zu zwei Größenordnungen über denen von [NiFe]-Hydrogenasen auf (bis zu 10.000 s^{-1}) [70]. Allerdings finden sich auch unter den [FeFe]-Hydrogenasen solche, die physiologisch als Aufnahme-Hydrogenasen fungieren, so z. B. die periplasmatische Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Diesem Enzym wird eine Schutzfunktion gegen oxidativen Stress zugeschrieben [71].

[FeFe]-Hydrogenasen sind im Vergleich zu [NiFe]-Enzymen deutlich lichtsensitiver und werden irreversibel durch O_2 und $\text{C}\equiv\text{O}$ inaktiviert. Strukturell treten sie überwiegend als Monomer auf, jedoch sind entgegen ursprünglicher Einschätzungen auch dimere, trinäre und tetramere Strukturen mit zusätzlichen FeS-Clustern bekannt [15,47,55]. Darüber hinaus spiegeln zahlreiche durch Genom-Sequenzierung annotierte, putative Gene die große Diversität innerhalb dieser Gruppe von Enzymen wieder, sowohl bezüglich der molekularen Masse der katalytischen Untereinheit als auch der modularen Enzymstruktur [47,72,73].

Das katalytische Zentrum von [FeFe]-Hydrogenasen, auch H-Cluster genannt, beinhaltet zwei Eisenatome, die in Korrelation ihrer Anordnung zum nächstgelegenen [4Fe-4S]-Cluster als proximal bzw. distal bezeichnet werden. Die Eisenatome koordinieren CO- und CN^- -Liganden [73-75] und sind über eine Dithiolat-Brücke, welche nach neueren Erkenntnissen ein Stickstoff-Atom im Zentrum beinhaltet, verknüpft ([72] und Abb. I.1a). Als Bindestelle für H_2 bzw. H^- wird das distale Fe-Atom angesehen [76,77]. Die Reifung von [FeFe]-Hydrogenasen wird durch drei Hilfsproteine bewerkstelligt, HydE, HydF und HydG, welche als Homologe in allen bekannten [FeFe]-Hydrogenase beherbergenden Organismen gefunden werden [78]. HydE und HydG sind SAM-Radikal-Enzyme, welche nach ursprünglichem Verständnis die CO- bzw. CN^- -Liganden aus Glycin [79] oder Tyrosin [80], sowie die Dithiolat-Brücke ausgehend von Cystein bereitstellen. Kürzlich wurde mithilfe von *in-vitro*-Reifungssystemen gezeigt, dass Tyrosin die Vorstufe aller [FeFe]-assoziierten CO- und CN^- -Liganden darstellt [81,82]. HydF, ein FeS-Protein mit GTPase Aktivität, wurde als Gerüstprotein für die Synthese des [FeFe]-Zentrums identifiziert [78]. Zellfreie Reifungsstudien sowie neuere spektroskopische Daten von gereinigtem HydF deuten darauf

hin, dass dieses als alleiniger Reifungsfaktor ausreicht und dass ein vollständig assembliertes [FeFe]-Zentrum bereits an HydF synthetisiert und von diesem auf das Hydrogenase-Apoprotein übertragen wird [83,84].

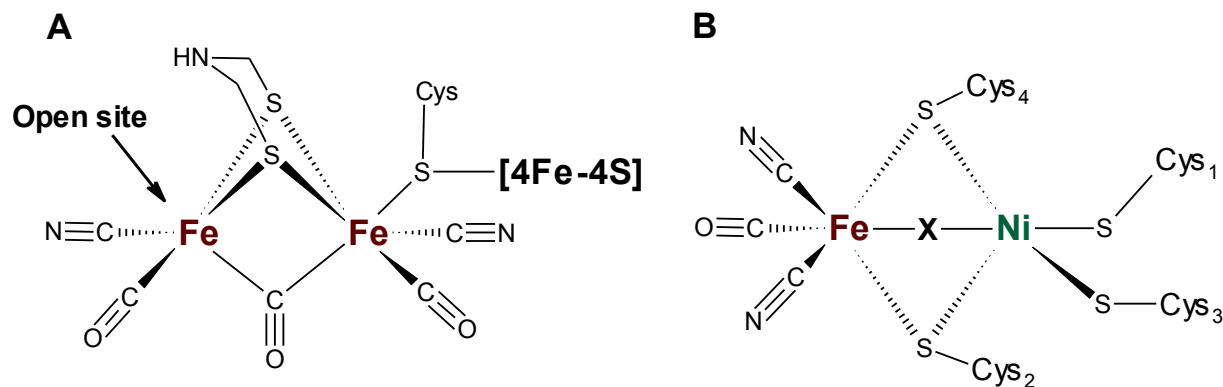


Abb. I.1 – Strukturen der katalytischen Zentren von [FeFe]- (A) und [NiFe]-Hydrogenasen (B). In [FeFe]-Hydrogenasen stellt das distale Fe-Atom (relativ zum nächstgelegenen FeS-Cluster) die H₂-Bindestelle, wie auch die Angriffsseite für Eintritt der Inhibitoren CO oder O₂ („open site“), dar. [NiFe]-Hydrogenasen enthalten einen dynamischen Brückenliganden (X), wobei in Abhängigkeit des Aktivierungszustands ein Peroxo-Ligand (Ni-A), Hydroxid-Ligand (Ni-B) oder Hydrid-Ligand (Ni-C; katalytisch aktiv) vermutet wird (siehe Abschnitt I.2.2.3.1).

I.2.2.3 [NiFe]-Hydrogenasen

Die am besten untersuchte und vielfältigste Gruppe H₂-aktivierender Enzyme wird durch die [NiFe]-Hydrogenasen gebildet, welche in methanogenen Archaea und verschiedenen Gruppen H₂-oxidierender Bakterien gefunden werden [15,55]. Vertreter dieser Enzymgruppe zeigen mitunter bemerkenswerte Unterschiede hinsichtlich ihrer Struktur, dem physiologischen Akzeptor, der katalytischen Effizienz, H₂-Affinität sowie Stabilität gegenüber Sauerstoff. Organismen, deren Habitat innerhalb eines aquatischen oder terrestrischen Ökosystems unmittelbar mit dem Vorliegen eines bestimmten Redoxpotentials verknüpft ist, koevolvierten mit den von ihnen beherbergten energieliefernden Enzymen. Daher korrelieren die Charakteristika einer bestimmten [NiFe]-Hydrogenase meist mit durch den Wirt und sein Habitat definierten Anforderungen [28,55,85]. Folglich weisen die Enzyme aus aeroben H₂-Oxidierern meist niedrige *K_M*-Werte (H₂ ist nur in Spuren vorhanden) sowie die höchste Toleranz gegenüber O₂ auf [86]. Aufgrund der Diversität kann in Übereinstimmung mit Sequenzabgleichen eine Einteilung der [NiFe]-Hydrogenasen in verschiedene phylogenetisch eigenständige Gruppen vorgenommen werden (Abschnitt I.2.2.3.1) [15,55,87].

Mitte der 1990er Jahre wurde die erste Kristallstruktur einer [NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* gelöst [88]. In Übereinstimmung mit weiteren Kristallstrukturen von Hydrogenasen aus *Desulfovibrio* Spezies [89-91] wurde sie als Prototyp der „Standard-

Hydrogenase“ angesehen. Das globuläre Basis-Heterodimer besteht aus einer großen Untereinheit (ca. 60 kDa), welche das bimetallische Zentrum tief im Molekülinneren einschließt sowie einer kleinen Untereinheit (ca. 30 kDa), die mit der großen Untereinheit über eine breite hydrophobe Kontaktfläche in Verbindung steht. Das [NiFe]-Zentrum wird durch vier Cysteinyl-Reste koordiniert, wobei das Eisenatom zusätzlich drei Nicht-Protein-Liganden, ein C≡O und zwei (C≡N)⁻, bindet ([92-94] und Abb. I.1b). Hydrophobe Gaskanäle zum aktiven Zentrum wurden als H₂-Eintrittswege beschrieben [95-97]. In [NiFeSe]-Hydrogenasen ersetzt ein Selenocystein das Nickel-koordinierende Cystein [98-100].

Die kleine Untereinheit stellt den Elektronentransport vom [NiFe]-Zentrum zur Proteinoberfläche (zum physiologischen Akzeptor/Donor) durch drei linear angeordnete FeS-Cluster sicher [88]. Diese werden als proximal, medial bzw. distal bezüglich ihrer Anordnung zum aktiven Zentrum bezeichnet. In „Standard-Hydrogenasen“ sind das proximale und distale FeS-Cluster [4Fe-4S]-Kubane, während in medialer Position ein [3Fe-4S]-Cluster mit vergleichsweise hohem Redoxpotential vorliegt. In [NiFeSe]-Hydrogenasen ist auch das mediale Cluster ein [4Fe-4S]-Kuban [98-101]. Das proximale [4Fe-4S]-Cluster, welches essentiell für die katalytische Aktivität ist [95], wird nach neueren Erkenntnissen in O₂-toleranten Hydrogenasen durch ein einzigartiges [4Fe-3S]-Cluster mit redoxplastischen Eigenschaften ersetzt ([102-106] und Abschnitt I.3.2).

I.2.2.3.1 Redoxzustand und O₂-Toleranz

Das Eisenatom im katalytischen Zentrum von [NiFe]-Hydrogenasen ist im Gegensatz zum benachbarten Nickelatom nicht redoxaktiv. Die Ni-Redoxzustände können mittels Infrarot-(FTIR-) bzw. EPR-Spektroskopie präzise untersucht werden und spiegeln den katalytischen bzw. den Aktivierungszustand des Enzyms wieder [23,107]. Die ursprünglichen mittels EPR detektierbaren paramagnetischen Zustände bildeten hierbei die zugrunde gelegte Nomenklatur: Ni_u-A („u“ für *unready*), Ni_r-B („r“ für *ready*) sowie Ni_a-C („a“ für *active*) stellen die drei Basis-Aktivierungszustände des Nickelatoms dar. Die unter aeroben Bedingungen isolierte oder gelagerte [NiFe]-Hydrogenase ist katalytisch inaktiv und weist einen der oxidierten Zustände, Ni-A oder Ni-B, auf. Die beiden Zustände unterscheiden sich in der Reaktivierbarkeit des Enzyms, hervorgerufen durch jeweils unterschiedliche Brückenliganden im aktiven Zentrum [108,109]. Ni_u-A bezeichnet den am stärksten oxidierten Zustand (mit einem möglichen Peroxo-Liganden), in welchem das Enzym nur durch lange und energieaufwändige Reduktion reaktiviert werden kann [107,110,111], während Hydrogenasen im Ni_r-B Zustand (möglicherweise mit einem Hydroxid-Liganden)

rasch unter reduktiven Bedingungen aktiviert werden können [112,113]. Ni_a-C stellt den katalytisch aktiven Zustand mit einem verbrückenden Hydrid-Ion dar [114,115]. Die weiteren, EPR-inaktiven Ni(II)-Zustände (z. B. Ni-S) sollen hier nicht vertiefend beleuchtet werden.

Der Unterschied zwischen O₂-toleranten und „Standard-Hydrogenasen“ zeigt sich in der Möglichkeit der autogenen O₂-Entgiftung. O₂-tolerante Hydrogenasen besitzen Mechanismen, die sie entweder vor O₂-Eintritt schützen (Abschnitt I.2.2.3.2; regulatorische Hydrogenasen) oder Sauerstoffspezies rasch durch Reduktion entsorgen können. Die drei *Cupriavidus necator* (Cn) Hydrogenasen, welche als Prototypen O₂-toleranter Enzyme angesehen werden, sind beispielsweise durch das Fehlen des Ni_u-A Zustands charakterisiert [116,117].

I.2.2.3.2 Einteilung

Die Klassifikation der [NiFe]-Hydrogenasen erfolgt mittels Abgleichungsmethoden auf Proteinsequenzebene, wodurch sich vier voneinander abzugrenzende Gruppen ergeben ([15,55] und Tabelle I.1). **Gruppe 1 (Membran-assoziierte Aufnahme-Hydrogenasen)** beinhaltet periplasmatische, energiekonservierende Enzyme, welche mit einem membranintegralen Cytochrom verknüpft und damit unmittelbar an die Reduktion des Chinon-Pools der Atmungskette gekoppelt sind. Sie generieren Elektronen niedrigen Potentials, die terminal auf die jeweiligen respiratorischen Akzeptoren wie beispielsweise O₂, NO₃⁻, Fumarat oder SO₄²⁻ übertragen werden [55]. Gruppe 1 repräsentiert strukturell keine streng homologe Gruppe. Das Enzym aus *Wolinella succinogenes* (HydABC) wird als Prototyp angesehen [118]. Weitere prominente Vertreter sind die MBH aus *Cupriavidus necator* (HoxGKZ, Abschnitt I.3.2) [119-121], die *E. coli* Hydrogenasen 1 (HyaAB) und 2 (HybOC) [122-125] sowie die zuvor als „Standard-Hydrogenasen“ bezeichneten Vertreter aus Sulfat-Reduzierern des Genus *Desulfovibrio*, von denen mehrere Kristallstrukturen vorliegen [88,90,91,97,126]. Die meisten [NiFe]-Hydrogenasen der Gruppe 1 sind mit einem Membran-Anker in Form einer dritten Untereinheit direkt in die Membran integriert, während der übrige Teil des Enzyms in Richtung des Periplasmas ausgerichtet ist. Der Export des reifen und gefalteten Enzyms erfolgt dabei überwiegend mittels des bekannten *membrane targeting and translocation* (Mtt) [127] oder *twin-arginine translocation* (Tat) [128] Signalwegs.

Innerhalb der **Gruppe 2** finden sich cytoplasmatisch lokalisierte **cyanobakterielle Aufnahme- sowie sensorische Hydrogenasen**. Die Rolle der cyanobakteriellen Aufnahme-Hydrogenasen wurde bereits in Abschnitt I.2.1 erläutert. Sie sind ausschließlich in N₂-fixierenden Cyanobakterien relevant, wo ihre Regulation mit jener der Nitrogenase gekoppelt ist [129]. Reduktionsäquivalente, welche im Zuge der H₂-Rezyklierung durch Gruppe 2

Hydrogenasen gebildet werden, können – wie beispielsweise in *Aquifex aeolicus* – zur CO₂-Fixierung in den reduktiven Tricarbonsäurezyklus eingeschleust werden [130].

Tabelle I.1 – Einteilung aller Hydrogenasen inklusive der [NiFe]-Hydrogenasen Untergruppen. Die Angaben wurden modifiziert nach [15,55].

Gruppe	Bezeichnung	Funktion	Domäne
[Fe]-Hydrogenase	Hmd	Hydrid-Transfer zur schrittweisen CO ₂ -Reduktion (Methanogenese)	Archaea
[FeFe]-Hydrogenase -		Hauptsächlich H ₂ -Bildung zur Entsorgung überschüssiger REQ ^a	Bacteria, Eukaryota
[NiFe]-Hydrogenase			
Gruppe 1	Membran-assoziierte Aufnahme-Hydrogenasen	Mobilisierung energiereicher Elektronen für die Atmungskette	Bacteria, Archaea
Gruppe 2a	Cyanobakterielle Aufnahme-Hydrogenasen	Energie-Rezyklierung	Bacteria
Gruppe 2b	H ₂ -sensierende, regulatorische Hydrogenasen	Transkriptionsregulation metabolischer Hydrogenasen	Bacteria
Gruppe 3a	F ₄₂₀ -reduzierende Hydrogenasen	Generierung von REQ ^a in Form von F ₄₂₀ H ₂ (Methanogenese)	Archaea
Gruppe 3b	NADP-reduzierende Hydrogenasen	Hauptsächlich H ₂ -Bildung zur Entsorgung überschüssiger REQ ^a	Bacteria, Archaea
Gruppe 3c	Methylviologen-reduzierende Hydrogenasen	Generierung von REQ ^a für Hetero-Disulfid-Reduktase (Methanogenese)	Archaea
Gruppe 3d	NAD(P)-reduzierende, bidirektionale Hydrogenasen	Generierung von REQ ^a , sowie Erhaltung des Redoxgleichgewichts	Bacteria
Gruppe 4	Ech-Hydrogenasen	Energiekonservierung	Bacteria, Archaea

^a REQ = Reduktionsäquivalente(n)

Sensorische bzw. regulatorische Hydrogenasen wurden bislang ausschließlich in Untergruppen der Proteobakterien gefunden, wo sie durch H₂-Wahrnehmung die Produktion von Aufnahme-Hydrogenasen auf Transkriptionsebene kontrollieren. Hierzu gehören beispielsweise die regulatorischen Hydrogenasen aus *Cupriavidus necator* (Abschnitt I.3.2.3 und [131-135]), *Bradyrhizobium japonicum* [136] und *Rhodobacter capsulatus* [137]. H₂-Sensoren sind gekennzeichnet durch ihre Sauerstoff-Stabilität. Diese wird durch verengte Gaskanäle, welche den Eintritt des O₂-Moleküls sterisch verhindern, gewährleistet [138,139]. In **Gruppe 3** sind **bidirektionale, heteromultimere, cytoplasmatische Hydrogenasen** zusammengefasst. Diese Enzyme, strukturell aus 2–6 Untereinheiten bestehend, koppeln die H₂-Aktivierung mit der Reduktion löslicher Kofaktoren wie NAD⁺, NADP⁺, F₄₂₀ oder Methanophenazin. Viele [NiFe]-Hydrogenasen dieser Gruppe werden in methanogenen Archaeen gefunden, wo sie zentrale H₂-abhängige Schritte katalysieren [28]. Cyanobakterien, aerobe H₂-oxidierende Bakterien und hyperthermophile Archaea (z. B. *Pyrococcus furiosus*) beherbergen weitere wichtige Vertreter dieser Enzymgruppe.

Die erste isolierte und charakterisierte NAD^+ -reduzierende Hydrogenase dieser Gruppe war die lösliche [NiFe]-Hydrogenase (SH) aus *C. necator* (Cn), welche das Zielenzym dieser Arbeit darstellt (Abschnitt I.3.3 und [140]). Die SH ist ein hexameres Enzym, bestehend aus den Untereinheiten HoxYHFUI₂. Homologe der SH finden sich in Cyanobakterien und weiteren phototrophen Bakterien, wobei sie dort als pentameres Enzym mit den Untereinheiten HoxYHFUE auftreten [141-145]. Das Hydrogenase-Modul HoxYH enthält das [NiFe]-Zentrum, während das zweite Modul, HoxFUE bzw. HoxFUI₂, als Kofaktor-Oxidoreduktase oder Diaphorase bezeichnet wird. Letzteres enthält meist Flavine (FAD/FMN) und weist strukturelle Ähnlichkeit mit der mitochondrialen NADH : Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) auf [146,147]. Enzyme dieser Gruppe werden als „bidirektional“ bezeichnet, da sie oftmals als zentrale Elektronenventile fungieren und in Abhängigkeit des zellulären NAD(P)H/NAD(P)^+ Pools reguliert werden. In phototrophen Prokaryoten sind starke H_2 -Bildungsraten in unmittelbarer Reaktion auf Belichtung beobachtet worden, die aus einem NADPH-Überschuss als Konsequenz erhöhter Photosystem-I-Bestrahlung resultieren [148]. Die Hydrogenasen I und II aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* sind NAD(P)H -abhängige Enzyme, denen physiologisch H_2 -Bildungsaktivität und darüber hinaus die Fähigkeit zur H_2 -abhängigen Reduktion elementaren Schwefels (S^0) zu H_2S nachgewiesen wurde [149].

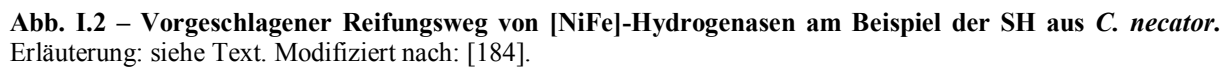
H_2 -evolvierende, Membran-assozierte, energiekonservierende (Ech) Hydrogenasen bilden die **Gruppe 4**. Ech-Hydrogenasen sind multimere Enzyme (sechs oder mehr Untereinheiten), welche in unterschiedlichste Stoffwechselprozesse eingebunden sind. In hydrogenotrophen Methanbildnern stellen sie reduziertes Ferredoxin für die Initiierung einerseits der CO_2 -Reduktion (zu Formyl-Methanofuran; Methanogenese) als auch der anabolen Biosynthesewege bereit [28]. Unter physiologischen Bedingungen ($\text{pH } 7$; $\text{pH}_2 = 10 \text{ Pa}$; $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}_{\text{red}} < 0,01$) ist die Reduktion von Ferredoxin ($E' = -500 \text{ mV}$) ausgehend von der Aktivierung von Wasserstoff ($E' = -300 \text{ mV}$ bei $\text{pH}_2 = 10 \text{ Pa}$) eine stark endergone Reaktion, welche im Falle der Ech-Hydrogenase durch Kopplung mit Protonen-/Iontentranslokation bewerkstelligt wird. Das in diesem Zusammenhang am besten untersuchte Enzym ist die Ech-Hydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* [150,151], welche in Übereinstimmung mit den vorherigen Ausführungen als Ionenpumpe fungiert [152]. Weiteren Hydrogenasen der Gruppe 4 wurde der umgekehrte Reaktionsweg ausgehend von reduziertem Ferredoxin nachgewiesen, wobei H_2 gebildet und gleichzeitig Protonen durch die Membran transportiert werden (Energiekonservierung). Ein Beispiel für eine solche ATP liefernde Hydrogenase ist die MBH aus *Pyrococcus furiosus* [153]. Bakterielle Ech-Hydrogenasen sind teilweise an die anaerobe

Oxidation von C1-Komponenten gekoppelt. Ein gut untersuchter Vertreter ist die Hydrogenase 3 (*hyc* Operon) aus *Escherichia coli*, welche Teil des Formiat-Hydrogenlyase Komplexes ist (FHL; Spaltung von Formiat in H₂ und CO₂) [53,54]. Eine multimere putative Hydrogenase 4 (*hyf* Operon), ebenfalls aus *E. coli*, wird gemäß Sequenzabgleich [15,55] ebenfalls in Gruppe 4 eingeordnet [154,155].

I.2.2.3.3 Biosynthese/Reifung

An der Synthese des aktiven Zentrums von [NiFe]-Hydrogenasen sind mindestens sieben Reifungsfaktoren beteiligt ([156-158] und Abb. I.2). Hierbei handelt es sich um die sogenannten Hyp („*hydrogenase pleiotropic*“) Proteine A, B, C, D, E und F sowie eine spezifische Endopeptidase, welche den Reifungsprozess durch C-terminale Verkürzung der katalytischen Untereinheit abschließt. In Proteobakterien liegen die *hyp* Gene geclustert und meist in unmittelbarer Nachbarschaft zu den jeweiligen Hydrogenase-Strukturgenen vor, während sie z. B. in Archaeen oftmals isoliert und über das Genom verteilt gefunden werden [28,55]. Anfang der 1990er Jahre wurden erstmals Produkte der *hyp* Gene in *E. coli* [159,160] sowie *C. necator* [161-163] untersucht. Die Reifungssysteme in diesen beiden Organismen sind heute die am besten untersuchten, insbesondere aufgrund der von Böck und Mitarbeitern geleisteten Pionierarbeiten zur Reifung der Hydrogenase 3 (HycE-Untereinheit) aus *E. coli* [164-179]. Homologe akzessorische Gene finden sich in allen bekannten [NiFe]-Hydrogenasen beherbergenden Organismen. Der Prozess wird generell als hochkonserviert angenommen [156].

Die erste nachweisbare Interaktion innerhalb der Reifungskaskade stellt die spezifische Bindung des Chaperons HypC an die Hydrogenase-Untereinheit dar (Abb. I.2: Schritt 1). HypC koppelt sich erst wieder nach der Komplettierung des katalytischen [NiFe]-Zentrums ab und verhindert so eine verfrühte Faltung („HypC Zyklus“, Abb. I.2: Schritte 1–4) [164,167,172]. Ein zweites HypC-Molekül bildet einen dynamischen Komplex mit HypD als Gerüst für den Aufbau und die Einschleusung der Eisen-Gruppe Fe[(CN)⁻₂CO]. Diese duale Funktion von HypC konnte im Falle der SH durch Isolierung sowohl stabiler HypC-HoxH- als auch HypC-HypD-Komplexe nachgewiesen werden ([180] und Abb. 21a,h). Der HypCD-Komplex koordiniert das Eisenatom und dirigiert die Liganden-Assemblierung (zwei CN⁻ und ein CO) sowie den anschließenden Transfer auf die H₂ase-Untereinheit. HypD besitzt ein oxidationssensitives [4Fe-4S]-Cluster. Es wird daher angenommen, dass der CN⁻-Transfer von HypE auf das HypCD-koordinierte Eisenatom einen HypD-abhängigen, redoxaktiven Schritt beinhaltet [176,179,181-183].



– 13 –

Liganden-Assemblierung bereits vor dem Transfer der Gruppe in die Hydrogenase-Untereinheit stattfindet (Abb. I.2: 2).

Der Übertragung des $\text{Fe}[(\text{CN})_2\text{CO}]$ -Zentrums schließt sich die Nickel-Einschleusung an (Abb. I.2: 3). Die Maturasen HypA und HypB beschleunigen den Einbau substantiell, sind jedoch für den Vorgang nicht essentiell (Abschnitt IV.7). Beide Proteine besitzen Bindestellen für Nickel-Ionen. In HypB liegt zusätzlich eine GTP-Bindestelle vor und GTPase-Aktivität wurde in mehreren Fällen nachgewiesen. Sowohl HypAB-Komplexbildung (Abb. III.21e,f,k) als auch GTP-Verbrauch wurden im Zuge der Nickel-Einschleusung demonstriert [165,189-194]. Die Präsenz des eingebauten Nickelatoms in Kombination mit einem spezifischen Erkennungsmotiv (in *Cn* HoxH: $\text{Cx}_2\text{Cx}_2\text{H/R}$) stellen die Voraussetzung für die abschließende C-terminale Verkürzung der Hydrogenase-Untereinheit dar (Abb. I.2: 5) [168,195]. Hydrogenasen besitzen zu diesem Zweck hoch spezifische Endopeptidasen [169,178,196-198], beispielsweise HoxW im Falle der SH aus *Cn* (Abspaltung von 24 Aminosäuren), HoxM im Falle der MBH aus *Cn* oder HycI im Falle der Hydrogenase 3 aus *E. coli*. Der Reifungsprozess wird abgeschlossen durch die Faltung der Untereinheit, wodurch das $[\text{NiFe}]$ -Zentrum umschlossen wird und sich in der Nähe der hydrophoben Kontaktfläche zur kleinen Untereinheit positioniert. Dadurch wird die Assemblierung des Holoenzym ermöglicht.

Eine weitere Maturase, HypX, wurde in phylogenetisch unterschiedlichen Bakteriengruppen gefunden, denen die Eigenschaft gemeinsam ist, H_2 unter aeroben Bedingungen umsetzen und damit O_2 -tolerante Hydrogenasen synthetisieren zu können [199-201]. Die genaue Funktion von HypX ist bislang nicht bekannt, jedoch hat seine Deletion phänotypisch eine Unfähigkeit zur aeroben H_2 -Aufnahme zur Folge [202]. $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen, welche aus ΔHypX -Stämmen isoliert wurden, zeigten den Verlust der O_2 -Toleranz und katalytische Eigenschaften, die denen der „Standard-Hydrogenasen“ ähneln (Abschnitt I.2.2.3) [203].

I.3 $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen aus *Cupriavidus necator*

I.3.1 Das „Knallgas“-Bakterium *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator (*Cn*; frühere Namen: *Hydrogenomonas eutrophus*; *Alcaligenes eutrophus*; *Wautersia eutropha*; *Ralstonia eutropha*) ist ein strikt respiratorisches, fakultativ chemolithoautotrophes Bakterium aus der Gruppe der β -Proteobakterien [204]. Es kann aus Böden sowie aquatischen Ökosystemen an der Aerob/Anaerob-Grenze isoliert werden und besitzt einen äußerst vielseitigen, auf diverse Umwelteinflüsse angepassten Metabolismus. Als Vertreter der „Knallgas“-Bakterien ist es in der Lage, mit H_2 als einziger Energiequelle

und O₂ als terminalem Elektronenakzeptor zu wachsen, wobei CO₂ über den Calvin-Benson-Bassham Zyklus fixiert wird [205]. Unter anaeroben Bedingungen ist *Cn* zur Nitratatmung (NO₃⁻) befähigt. Zum fermentativen Stoffwechsel ist der Organismus nach bisherigem Kenntnisstand nicht in der Lage [206].

In Abwesenheit von H₂ kann *Cn* einen chemoorganoheterotrophen Stoffwechsel betreiben, wobei Fruktose, Formiat, Pyruvat, bestimmte Aminosäuren oder Intermediate des Krebs-Zyklus als Energiequellen dienen, nicht jedoch Glucose [204]. Bei Stickstoff- bzw. Phosphatmangel kann das Bakterium Polyhydroxybuttersäure (PHB) als Speicherstoff synthetisieren. *Cn* ist ein Modellorganismus für autotrophes Wachstum, die Bildung von O₂-toleranten Hydrogenasen sowie für Anwendungen in der Umweltbiotechnologie (Denitrifikation und Aromatenabbau [207]) und der industriellen Biotechnologie (Bioplastik-Produktion [208-210]).

I.3.2 Wasserstoff-Metabolismus in *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator besitzt hinsichtlich des stoffwechselphysiologischen Umschaltens in Abhängigkeit sich ändernder Bedingungen einzigartige Regulationsmechanismen, welche seit mehreren Dekaden intensiv untersucht werden [211]. Der Organismus ist zu einem mixotrophen Stoffwechsel in der Lage [212], da die Enzyme des Krebs-Zyklus selbst während des lithotrophen Stoffwechsels präsent und aktiv sind [211]. Dies und andere Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass das Bakterium einen heterotrophen Kern-Metabolismus besitzt und seinen heutigen lithoautotrophen Stoffwechsel evolutionär erst später erwarb [133,211,213-215]. Zentrale Enzyme des lithotrophen Stoffwechsels stehen unter globaler Kontrolle genomischer Regulatoren [216,217]. Deshalb erscheint es nicht verwunderlich, dass die Expression der Gene für Hydrogenasen, Enzyme des Calvin-Zyklus sowie weiterer pHG1-kodierter Proteine nicht exklusiv unter lithotrophen Bedingungen induziert werden, sondern teils im Zuge einer generellen Stress-Antwort als Reaktion auf energielimitierende, redoxabhängige zelluläre Bedingungen. Unter heterotrophen Bedingungen können unterschiedliche Energiesubstrate, allen voran Glycerin, solche Bedingungen direkt induzieren [214]. Zum Vergleich: Bei Wachstum auf Succinat oder Pyruvat zeigt *Cn* maximale Wachstumsraten und die komplette Repression der Gene des lithotrophen Stoffwechsels [211,214]. Unter lithotrophen Bedingungen (H₂, CO₂) wie auch bei Wachstum auf Glycerin verlangsamt sich die Wachstumsgeschwindigkeit und es kommt zur Expression der Gene für lithotrophen Stoffwechsel, während Gene anderer zentraler Stoffwechselwege herunterreguliert werden. Dieses Verhalten weist Ähnlichkeiten zu generellen Stressantworten

anderer Bakterien auf [218]. Überdies ist die Expressionsrate der die energieliefernden Hydrogenasen kodierenden *Cn* Gene bei Wachstum auf Glycerin sogar um ein Vielfaches höher als bei Wachstum auf H₂, O₂ und CO₂ ([203,214,219,220] und Abschnitte III.2.1, IV.2). *Cn* besitzt mindestens drei [NiFe]-Hydrogenasen [221] (Abb. I.3): Die periplasmatische Membran gebundene Hydrogenase (*Membrane Bound Hydrogenase*, MBH), ein trinärer Komplex bestehend aus HoxG, HoxK und HoxZ, gehört zu den energiekonservierenden Aufnahme-Hydrogenasen der Gruppe 1 (siehe Abschnitt I.2.2.3.2) [119-121,222]. HoxG (67 kDa) enthält das [NiFe]-Zentrum. Die dort mobilisierten Elektronen werden durch HoxK (35 kDa), der kleinen Untereinheit, mittels einer Reihe von FeS-Clustern auf ein membran-integrales di-Häm-Cytochrom *b* (HoxZ Untereinheit; 28 kDa) übertragen und so direkt in den Chinol-Pool der Atmungskette eingespeist. Die MBH liegt physiologisch als Membran gebundener Superkomplex, bestehend aus drei HoxGKZ-Einheiten, vor [223]. Sie gehört seit kurzem zu den ersten O₂-toleranten Hydrogenasen, deren Kristallstruktur gelöst wurde [103,106]. Im Zuge dessen bestätigte sich die Vermutung, dass das Attribut der O₂-Toleranz bei Vertretern der Gruppe-1-[NiFe]-Hydrogenasen durch ein einzigartiges proximales [4Fe-3S]-Cluster, koordiniert durch sechs Cysteinyln-Reste, verliehen wird [102,105,224,225]. Dieses FeS-Cluster besitzt redoxplastische Eigenschaften, welche einen raschen „Rücktransport“ von Elektronen zum [NiFe]-Zentrum und dadurch die reduktive Entfernung von Sauerstoffspezies in Form von H₂O ermöglichen. Es wird vermutet, dass der Reifungsfaktor HoxR in *C. necator* für die Insertion des [4Fe-3S]-Clusters in HoxK unter aeroben Bedingungen benötigt wird [226,227].

Die cytoplasmatische, bidirektionale NAD⁺-reduzierende Hydrogenase (*Soluble Hydrogenase*, SH) stellt das Zielenzym dieser Arbeit dar und wird ausführlich in Abschnitt I.3.3 beschrieben. Während die Deletion der MBH zu keinerlei Veränderungen im Wachstumsverhalten von *Cn* unter lithoautotrophen Bedingungen führt, hat das Fehlen der SH unter diesen Bedingungen eine Verminderung der Wachstumsrate von bis zu 70% zur Folge [228]. Dadurch zeigt sich die zentrale Rolle der SH als energielieferndes und gleichzeitig regulierendes Enzym [133,205,211,215,228]. Die SH ist physiologisch hauptsächlich als Aufnahme-Hydrogenase relevant und koppelt die H₂-Oxidation mit der Bildung von NADH, welches für die CO₂-Fixierung und Atmungskette benötigt wird. Wie alle bidirektionalen Hydrogenasen (Gruppe 3) fungiert sie darüber hinaus als wichtiges Elektronen-Ablassventil zur Erhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts. Tatsächlich kann unter bestimmten Bedingungen H₂-Bildung durch die SH beobachtet und auch induziert werden [140,229].

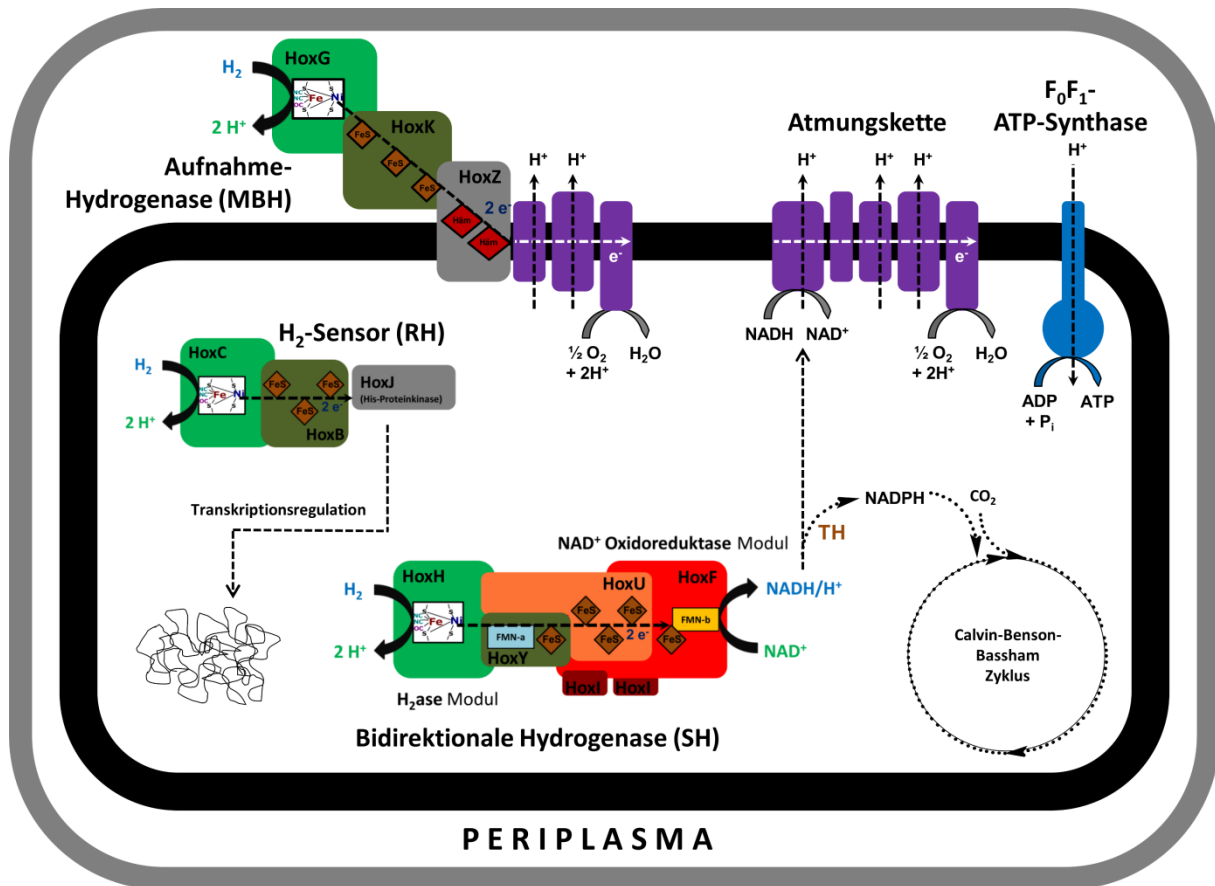


Abb. I.3 – Physiologische Funktion der drei [NiFe]-Hydrogenasen aus *Cupriavidus necator*. Die MBH ist eine periplasmatische Aufnahme-Hydrogenase, welche energiereiche Elektronen aus der H_2 -Spaltung direkt in die Atmungskette einspeist. Die bidirektionale, cytoplasmatische SH fungiert - solange ein zellulärer NAD^+ -Überschuss vorliegt - als Aufnahme-Hydrogenase und stellt NADH für die Atmungskette oder für die CO_2 -Fixierung bereit. Für letztere wird NADPH benötigt, welches ausgehend von NADH durch Transhydrogenasen (TH) bereitgestellt wird. Eine regulatorische Hydrogenase (RH) fungiert als H_2 -Sensor und reguliert die Transkription der MBH- und SH-Gene durch Phosphorylierung eines globalen Regulators. Teile der Abbildung wurden von [221] adaptiert.

Die Regulation der Produktion energieliefernder Hydrogenasen in *Cn* ist nicht ausschließlich der zuvor beschriebenen redoxabhängigen Stressantwort unterworfen. Eine H_2 -Wahrnehmung und damit Transkriptionskontrolle in Abhängigkeit der H_2 -Konzentration erfolgt durch eine regulatorische Hydrogenase (RH), bestehend aus den Unterheiten HoxC (52 kDa) und HoxB (36 kDa) [131,132]. Die RH ist in der Form zweier HoxBC-Heterodimere, gekoppelt mit einer Histidin-Proteinkinase (HoxJ), aktiv [230-232]. Der genaue Signalmechanismus ist nicht vollends geklärt. Es wird angenommen, dass ein globaler Transkriptionsregulator in Abhängigkeit der H_2 -Konzentration durch den RH/HoxJ-Komplex phosphoryliert wird, woraufhin dieser die Transkription der SH- und MBH- Struktur-, und Hilfgene initiiert [230]. Struktur-, sowie akzessorische Gene der Hydrogenasen in *Cn* sind in drei Clustern auf dem pHG1 Megaplasmid organisiert ([233-236] und Abb. III.1). Die MBH- sowie RH-

Strukturgene sind auf einen 22 Kilobasen (kb) umspannenden Locus beschränkt. In Nachbarschaft der MBH-Strukturgene *hoxGKZ* befinden sich die für die MBH-Reifung essentiellen akzessorischen Gene *hoxMLOQRTV* sowie ein vollständiger Satz pleiotroper Reifungsgene, *hypA1B1F1C1D1E1X*. Das Cluster wird vervollständigt durch die für den H₂-Sensor relevanten Gene *hoxABCJ* sowie *hoxNI*, welches eine hochaffine Nickel-Permease kodiert [237-241]. Das SH-Cluster beinhaltet die Strukturgene *hoxFUYHI*, das dazwischen liegende *hoxW* (welches die SH-spezifische Endopeptidase kodiert) sowie einen partiellen Satz duplizierter *hyp* Gene (*hypA2B2F2*; Abb. III.1).

Räumlich zwischen den MBH- sowie SH-assoziierten Genregionen auf dem pHG1 Megaplasmid befindet sich ein Cluster, welches zwei Gene (PHG064, PHG065) mit Kodierungskapazität für eine vierte [NiFe]-Hydrogenase enthält [206,236]. Da *Cn* in Abwesenheit der MBH- und SH-Strukturgene die Fähigkeit zur H₂-Aufnahme verliert, steht die phänotypische Demonstration einer zusätzlichen Aufnahme-Hydrogenase bisher aus [134]. Gemäß einer kürzlich veröffentlichten Studie handelt es sich hierbei jedoch um eine funktionale „Aktinobakterielle Hydrogenase“ (AH), deren Eigenschaften sich deutlich von denen der SH, MBH und RH unterscheiden ([242] und Abschnitt IV.6). Die Strukturgene liegen in Nachbarschaft zu einem vollständigen Satz *hyp*-Gene (*hypF3C2D2E2A3B3*) sowie einem Gen PHG070, welches eine putative C-terminale Endopeptidase kodiert (Abb. III.1).

I.3.3 Die bidirektionale, NAD⁺ reduzierende Hydrogenase (SH)

Die SH ist, wie alle bidirektionalen [NiFe]-Hydrogenasen, ein aus zwei funktional voneinander abzugrenzenden Modulen aufgebautes multimeres, cytoplasmatisches Enzym mit den Untereinheiten HoxH (55 kDa), HoxY (23 kDa), HoxU (26 kDa), HoxF (66 kDa) sowie HoxI₂ (19 kDa je Monomer) [243] (Abb. I.4). HoxH, die große Untereinheit des Hydrogenase-Dimers HoxYH, beinhaltet sechs für [NiFe]-Hydrogenasen typische konservierte Motive [244,245] und durchläuft einen komplexen posttranslationalen Reifungszyklus zur Einschleusung des [NiFe]-Zentrums (Abschnitt I.2.2.3.3). Die kleine Untereinheit HoxY stellt eine verkürzte Variante verglichen mit „Standard-Hydrogenasen“ dar. Sie besitzt lediglich ein [4Fe-4S]-Cluster und als einzigartiges Charakteristikum einen reversibel gebundenen FMN-Kofaktor (FMN-a), welcher sich innerhalb des SH-Holoenzym in unmittelbarer Nachbarschaft zum [NiFe]-Zentrum von HoxH befindet [246]. Allen bisherigen Analysen zufolge und in Übereinstimmung mit der Präsenz konservierter Cysteinyln-Reste sind innerhalb des Diaphorase-Moduls HoxFU drei [4Fe-4S]- sowie ein [2Fe-2S]-Cluster vorhanden. Die Elektronentransportkette innerhalb des Moduls wird

vervollständigt durch einen kovalent gebundenen FMN-Kofaktor (FMN-b) [246-248]. HoxFU weist große Ähnlichkeit zu den peripheren Untereinheiten der NADH : Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) auf [249].

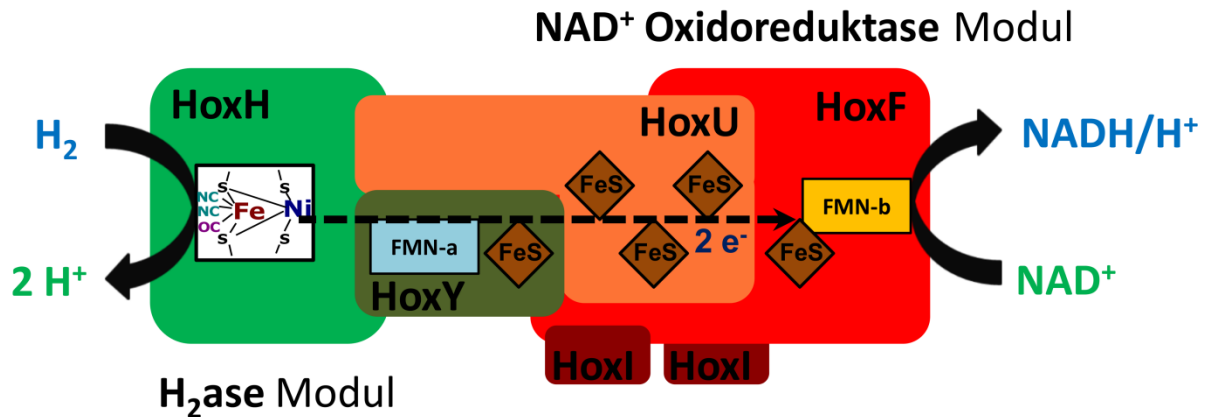


Abb. I.4 – Struktur der SH aus *Cupriavidus necator*. Erläuterungen: siehe Text. Für alle dargestellten FeS-Cluster wurden anhand von Koordinationsmotiven innerhalb der AS-Sequenz [4Fe-4S]-Kubane vorgeschlagen. Lediglich bei einem der HoxU-gebundenen Kofaktoren handelt es sich wahrscheinlich um ein [2Fe-2S]-Cluster.

Die SH stellt die erste bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase dar, welche gereinigt und biochemisch charakterisiert wurde, wobei von einer tetrameren Struktur (HoxHYUF) ausgegangen wurde [140,250,251]. In späteren Arbeiten wurde jedoch durch Anpassung der Reinigungsbedingungen ein höhermolekularer Komplex isoliert, welcher zusätzlich ein mit HoxFU assoziiertes Dimer, HoxI₂ enthält [243]. HoxI besitzt keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit der in cyanobakteriellen Gruppe 3 Hydrogenasen vorhandenen Untereinheit HoxE. Vielmehr beinhaltet es eine putative Nukleotid-Bindestelle in der zentralen Domäne und ermöglicht eine Aktivierung der oxidierten SH in Anwesenheit von NADPH [243].

Die SH ist charakterisiert durch eine außergewöhnliche O₂-Toleranz². EPR-, sowie FTIR-spektroskopische Daten zu den oxidierten wie auch reduzierten Zuständen bezeugen, dass das Enzym sich von allen anderen bisher analysierten Hydrogenasen unterscheidet [116,252-254]. Die Daten führten zunächst zu dem Vorschlag, dass die SH ein modifiziertes [NiFe]-Zentrum mit zwei zusätzlichen (C≡N)⁻-Liganden besitzt, von denen einer mit Nickel koordiniert ist [202,254]. Diese These wurde jedoch durch *in-situ*-EPR- und FTIR-Messungen widerlegt, so dass der Mechanismus der O₂-Toleranz momentan erneut zur Diskussion steht [255-257]. Die separaten Module HoxYH sowie HoxFU wurden kürzlich biochemisch charakterisiert

² ‚O₂-Toleranz‘ im Gegensatz zu ‚O₂-Stabilität‘ bezeichnet die Eigenschaft eines Enzyms, die physiologische katalytische Reaktion selbst bei Anwesenheit von O₂ bewerkstelligen zu können. Demgegenüber kann ein ‚O₂-stabiles‘ Enzym in Anwesenheit von O₂ gereinigt und gelagert werden, ist jedoch zunächst katalytisch inaktiv.

[247,253]. Die daraus gewonnenen Daten führten zu dem momentanen Konsens, dass die beiden FMN-Kofaktoren zentrale Rollen in der Bidirektionalität, verbunden mit der schnellen reduktiven Entfernung von Sauerstoffspezies am [NiFe]-Zentrum einnehmen [246,247]. Das HoxY-assoziierte und in unmittelbarer Nähe des [NiFe]-Zentrums positionierte FMN-a könnte hierbei als 2-zu-1 Elektronenkonverter fungieren. Dies stimmt mit der Feststellung überein, dass die im Falle von „Standard-Hydrogenasen“ beobachteten Nickel-Redoxzustände (siehe Abschnitt I.2.2.3.1) für die SH spektroskopisch nicht erfasst werden können [116,252]. Die SH kann verschiedene für [NiFe]-Hydrogenasen typische redoxaktive Akzeptoren bzw. Donatoren nutzen [140]. Durch Reduktion des Enzyms über längere Zeiträume mit katalytischen Mengen NADH unter H₂-Atmosphäre sowie im Verlauf des H₂-Umsetzungszyklus findet eine Konformationsänderung innerhalb der SH statt, die zur „Öffnung“ des Enzyms, dem Verlust von HoxY-gebundenem FMN-a sowie zur Freigabe des [NiFe]-Zentrums führt [246]. Durch diese Freisetzung von FMN-a kommt es zu einem Abbruch der Elektronentransportkette (Verlust der H₂:NAD⁺ Aktivität) zwischen dem [NiFe]-Zentrum und den FeS-Clustern. Folglich wird die Reduktion von z. B. Benzylviologen mit H₂ unter diesen Bedingungen nicht beeinflusst, da dieses direkt mit dem „exponierten“ [NiFe]-Zentrum reagieren kann [246].

I.4 Biotechnologisches Potential von Hydrogenasen

Biotisch generierter Wasserstoff („*Biohydrogen*“) kann der Aktivität von [FeFe]- oder [NiFe]-Hydrogenasen sowie dem Enzym Nitrogenase entstammen (Abschnitt I.2.1). Die effizientesten H₂-bildenden Enzyme sind [FeFe]-Hydrogenasen. Ebenso wie Nitrogenasen werden sie jedoch in Anwesenheit von O₂ irreversibel zerstört [258,259]. Im Zuge der Ergründung der Struktur, des katalytischen Mechanismus sowie molekularer Hintergründe der Sensitivitäten werden Möglichkeiten eröffnet, strukturelle Modifikationen vorzunehmen, um diesen Enzymen höhere Stabilitäten gegenüber O₂ und CO aufzuprägen [260,261]. Gleichzeitig wurden chemische Analoga (Hydrogenase-mimetische Strukturen) synthetisiert, welche teilweise bereits mit beachtlicher Effizienz H₂ aktivieren oder generieren können [262,263]. [NiFe]-Hydrogenasen sind natürlicherweise durch eine höhere Stabilität gegenüber O₂ charakterisiert. Die Fähigkeit der H₂-Umsetzung selbst bei Anwesenheit von O₂ (Attribut der O₂-Toleranz) findet sich jedoch nur bei wenigen Vertretern dieser Klasse [227,264]. Im Zuge der biotechnologischen H₂-Herstellung wurde in den meisten Fällen auf Organismen zurück gegriffen, bei denen natürlicherweise H₂-Bildung induziert werden kann. Die Optimierung dieser H₂-Bildungsprozesse wurde entweder durch gentechnische Veränderung

(*Metabolic engineering*) oder Modifikation der Prozessparameter vorgenommen. Jedoch verbleiben in jedem dieser Ansätze thermodynamische Barrieren als hauptsächliche Beschränkungen der Effizienz [50-52]. Die Bildung von H_2 durch anaerobe, fermentierende Organismen (*dark fermentation*) kann selbst bei vollständiger Umsetzung zu Acetat, H_2 und CO_2 maximal 4 Mol H_2 pro Mol Hexose liefern. Aufgrund der simultanen Bildung weiterer Nebenprodukte fällt die Ausbeute meist noch niedriger aus [51].

Auch die Nutzung phototropher H_2 -Bildner ist derzeit noch deutlichen Beschränkungen unterworfen. Hierbei werden die Prozesse der direkten und der indirekten Biophotolyse unterschieden, abhängig von der simultanen oder zeitlich bzw. räumlich getrennten Bildung von O_2 und H_2 . Hier resultiert die klare Beschränkung der H_2 -Bildung erneut aus der O_2 -Sensitivität der H_2 -Bildungssysteme [50]. Photoheterotrophe Bakterien sind zur H_2O -Spaltung nicht in der Lage und benötigen organische Substrate (meist Acetat oder andere Carbonsäuren) als Elektronendonatoren. Aufgrund dessen wurden 2-Stufen-Prozesse zur H_2 -Generierung im Labormaßstab realisiert [265-267]. Bei diesen Prozessen wird ein fermentierbares Substrat (z. B. Glucose) im ersten Schritt durch ein Konsortium anaerober Bakterien (z. B. Vertreter der Genera *Clostridium* oder *Enterobacter*) zu niederkettigen Säuren, H_2 und CO_2 fermentiert. Photoheterotrophe Bakterien (z. B. Genus *Rhodobacter*) nutzen in der zweiten Stufe die Carbonsäuren und setzen diese mit der Energie aus Sonnenlicht zu H_2 und CO_2 um. Die höchste bisher erreichte Ausbeute bei Nutzung dieses Prozesses liegt bei 7,2 Mol H_2 pro Mol Hexose [267].

Eine zukünftige effiziente, kohlenstoffneutrale und rein solarbasierte Bereitstellung von Wasserstoff könnte durch die Integration O_2 -toleranter Hydrogenasen in den Prozess der direkten Biophotolyse erreicht werden. Prototypen dieser Kopplung wurden bereits durch die Verknüpfung des Photosystems I (PSI) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 mit der MBH aus *Cn* [268-270] oder mit einer [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium acetobutylicum* [271,272] demonstriert. Hierbei wird das Redoxpotential des terminalen PSI-FeS-Clusters ($E^{0'} < -500$ mV) zur direkten Protonenreduktion ($E^{0'} = -413$ mV) ohne die Zwischenstufe NAD(P)H ($E^{0'} = -320$ mV) genutzt. Allerdings steht bei diesbezüglichen *in-vitro*-Demonstrationen eine Verknüpfung mit PSII, also dem wasserspaltenden System, bisher aus.

H_2 -Aktivierung stellt den zweiten Nutzungsbereich O_2 -toleranter Hydrogenasen dar. Die Fähigkeit bidirektionaler [NiFe]-Hydrogenasen, das intrazelluläre Redoxgleichgewicht zu kontrollieren, kann als thermodynamische Triebfeder für die Optimierung ganzer Biosynthesewege dienen. Als Beispiel sei die mikrobielle Lösemittelproduktion (z. B. Butan-1-ol) genannt, bei der aus H_2 generierte Reduktionsäquivalente (NADH) die Redoxbalance in

Richtung der reduzierten Zielverbindung (hier Butanol) sicherstellen könnten [273]. Analog kann diese Fähigkeit auf die Nutzung der Enzyme in technischen Anwendungen außerhalb der Zelle (*in vitro*) übertragen werden. Die Anwendung bidirektionaler [NiFe]-Hydrogenasen bei industriellen Kofaktor-abhängigen Biokatalysen hat den entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Kofaktor-regenerierenden Enzymen, dass bei Umsetzung von H_2 keinerlei Nebenprodukte entstehen und Umsätze nahe 100% erreicht werden können [274,275].

Prototypen enzymatischer Brennstoffzellen wurden bereits erfolgreich getestet. Hierbei werden ein H_2 -spaltendes Enzym (O_2 -tolerante Hydrogenase) und ein O_2 -reduzierendes Enzym (Laccase) auf einer Graphit-Anode bzw. -Kathode immobilisiert und die bei der Reduktion von O_2 übertragenen Elektronen als Strom abgegriffen [276-278]. Die Vorteile dieses Systems gegenüber Pt-, oder Pd-basierten Brennstoffzellen sind vielfältig: Eine Membranseparation ist beispielsweise nicht notwendig. Gleichzeitig kann aufgrund der CO -Toleranz und der Selektivität der Hydrogenase „Substratgas“ unterschiedlicher Qualität und variablen H_2 -Gehalts eingeleitet werden. Darüber hinaus liegt der Arbeitsbereich der Enzyme innerhalb milder Reaktionsparameter, was sich maßgeblich auf den Energiebedarf auswirkt.

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Bahnbrechende Erfolge auf dem Gebiet der Genomik und Informationstechnologie erhöhen jährlich die Anzahl sequenzierter Genome und damit die Erschließung und Annotierung zuvor unbekannter Protein-kodierender Gene. Durch Nutzung dieser genetischen Informationen werden innerhalb der synthetischen Biologie Wege hin zu komplett künstlich designten zellulären Systemen beschritten. Mithilfe dieser Systeme gewinnt der Mensch Einfluss auf die gerichtete Synthese bestimmter natürlicher oder artifizieller Produkte, von der Konvertierung einfacher Substrate zu Lösemitteln oder Biotreibstoffen bis hin zu maßgeschneiderten Biokatalysatoren. Heterologe Biosynthesewege werden oftmals durch große Mengen genetischer Information kodiert, was in steigenden Anforderungen an gentechnische und molekularbiologische Werkzeuge für den Transfer in den Zielorganismus, sowie die Expression innerhalb diesem, resultiert.

Ein prominentes Beispiel für derartige Multigen-Expressionsversuche ist die heterologe Produktion von [NiFe]-Hydrogenasen [279,280]. Die Barrieren hinsichtlich der erfolgreichen funktionalen Synthese dieser Enzyme können durch folgende Punkte umschrieben werden: i) Die spezifische Reifungsmaschinerie einer bestimmten Hydrogenase ist in den meisten Fällen weder auf Protein-, noch auf Kodierungsebene vollständig untersucht und ii) die kommerziellen sowie literaturbeschriebenen gentechnischen Werkzeuge sind mit starken

Einschränkungen behaftet. Systeme für die Koexpression einer beliebigen Anzahl heterologer Gene, kombiniert mit der Hochausbeute-Produktion bei gleichzeitiger Funktionalität aller Genprodukte, wurden bis dato nicht entwickelt. Als Konsequenz beschränkte sich die Produktion rekombinanter [NiFe]-Hydrogenasen bisher entweder auf den Einsatz nah verwandter Zielorganismen unter Ausnutzung eines Teils des endogenen Reifungsapparats [268,281-284] oder die aufwändige Konstruktion artifizieller Vektoren, was jedoch in eher geringen Mengen funktionaler Hydrogenase resultierte ([285-289] und Abschnitt IV.3).

Ziel dieser Arbeit war die Produktion einer funktionalen O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenase in *Escherichia coli*. Aufgrund seiner biotechnologischen Bedeutung wurde die SH aus *Cupriavidus necator* als Zielenzym ausgewählt. Das Enzym gilt als Prototyp O₂-toleranter Hydrogenasen und war der erste Vertreter seiner Klasse, welcher vor fast 40 Jahren isoliert [140] und seitdem intensiv biochemisch und spektroskopisch charakterisiert wurde [116,203,243,244,246-248,250,253,254,290-299]. Im ersten Schritt sollte ein Klonierungs-, und Expressionswerkzeug entwickelt werden, an welches folgende Ansprüche gestellt wurden: i) Das System sollte schnelle, gerichtete sowie effiziente Klonierung und Assemblierung erlauben; ii) Die Anzahl der zu transferierenden heterologen Gene sollte nicht beschränkt sein; iii) Um Variabilität hinsichtlich des experimentellen Designs zu ermöglichen (z. B. Deletions- und Komplementationsstudien, als „Reifungsstudien“ zusammengefasst), sollten Optionen zur Vektorkombinatorik implementiert werden; iv) Alle Genprodukte sollten unabhängig von Nukleinsäure-Sekundärstrukturen oder der Neigung zur Aggregation funktional in adäquaten Mengen in *E. coli* produziert werden können. Kernziel war folglich die Entwicklung einer Hochausbeute-Expressionsplattform für das Zielenzym, verbunden mit der Möglichkeit, die daraus erwachsende metabolische Kapazität künftig mit maßgeschneiderten Stoffwechsel- oder Biosynthesemodulen kombinieren zu können.

Aufgrund der erfolgreichen Bewerkstelligung dieses Kernvorhabens (Abschnitte III.1–3) diente das entwickelte System im weiteren Verlauf der Arbeit als Basis für die Definierung weiterer Teilziele. So wurden Möglichkeiten untersucht, erstmals tiefergehende Einblicke in den Reifungsprozess der SH und die Funktionalität von insgesamt 16 putativen akzessorischen Genprodukten aus *Cupriavidus necator* zu gewinnen (Abschnitt III.4). Reifungsintermediäre Komplexe sollten isoliert und Effekte bei Deletion oder Substitution einzelner Hyp-Komplexe demonstriert werden. Somit lag eine Herausforderung dieser Arbeit in der Demonstration der Effektivität, mit welcher die bisher auf Wirtsorganismen beschränkten „Knockout“-Studien und andere Gebiete der Grundlagenforschung künftig durch einheitliche kombinatorisch-gentechnische Werkzeuge ersetzt werden könnten.

II MATERIAL & METHODEN

II.1 Material

II.1.1 Software-, und Internet-Tools

Virtuelle Klonierungen und die Erstellung von Plasmidkarten erfolgte mittels pDRAW32 (Aacalone). Sequenzalignments und –analysen auf Nukleinsäure-, oder Proteinebene (BLAST, ClustalW, Tools für Sekundärstrukturen und Proteincharakteristika, etc.) erfolgten mit der Internet-Plattform SDSC Biology Workbench 3.2 [300]. Bilderzeugung und -bearbeitung erfolgte mit den Programmen ImageJ [301,302] sowie GIMP. Zur Literatur-, und Sequenzrecherche wurden öffentliche Datenbanken (NCBI, PubMed, BLAST, etc.) genutzt.

II.1.2 Chemikalien, Gase und molekularbiologische Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* von folgenden Herstellern bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), VWR International (Darmstadt), IBA (Göttingen), Bio-Rad (München) oder Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA). Verbrauchsmaterial wurde von VWR (Darmstadt), Sartorius (Göttingen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Gase wurden mit dem Reinheitsgrad 5 von Messer Industriegase (Bad Soden) bezogen. Molekularbiologische Kits und Enzyme sowie Nukleinsäure-, und Proteinstandards wurden von Fermentas/Thermo Scientific (Schwerte) bzw. Invitrogen (Darmstadt), und Chromatographie-Materialien und –Säulen sowie Zubehör von GE Healthcare (München) oder IBA (Göttingen) bezogen.

II.1.3 Primer und Oligonukleotide

Eine vollständige Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligonukleotide findet sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle VI.1). Synthetische Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

II.1.4 Bakterienstämme und Basisplasmide

Tabelle II.1 – Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Wildtyp; SH ⁺ , MBH ⁺	DSM428, ATCC 17699
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21Star (DE3)	<i>F' ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysE	<i>F' ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) <i>pLysE/RARE [argU argW ileX glyT leuW (proL)] (Cam^R)</i>	Novagen

Tabelle II.2 – Liste der Originalplasmide. Neu synthetisierte Vektoren und Konstrukte: Tabelle VI.2.

Plasmid	Charakteristik	Quelle
pE / pENTRY	StarGate-Entry-Klonierungsvektor; Kan ^R ; ColE1 ori; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pFF.rbs3a*	Std. StarGate- Fusions-US Vektor (für Polycistronen); Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer
pFF.c*	Std. StarGate- Fusions-DS Vektor (für Polycistronen); Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer
pFn1	pFF.rbs3a Rückgrat; <i>LguI</i> insertion site; US-Orientierung; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer
pFc1	pFF.rbs3a Rückgrat; <i>LguI</i> insertion site; DS-Orientierung; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer
pASG-IBAw1	StarGate-P _{Tet} -Expressionsvektor; Pseudo-wt; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pASG-IBA3	StarGate-P _{Tet} -Expressionsvektor; 3'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pASG-IBA5	StarGate-P _{Tet} -Expressionsvektor; 5'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pPSG-IBAw1	StarGate-P _{T7} -Expressionsvektor; pseudo-wt; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pPSG-IBA3	StarGate-P _{T7} -Expressionsvektor; 3'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pPSG-IBA5	StarGate-P _{T7} -Expressionsvektor; 5'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z	T. Selmer / IBA
pACYCDuet-1	Duet Expressionsvektor; p15A ori; Cam ^R	Novagen
pCDFDuet-1	Duet Expressionsvektor; CloDF1 ori; Sm ^R	Novagen
pRSFDuet-1	Duet Expressionsvektor; RSF ori; Kan ^R	Novagen

* pFF.rbs3a und pFF.c entsprechend den StarGate-Fusionsvektoren pNFUSE-IBA11 sowie pCFUSE-IBA11, wobei pFF.rbs3a verglichen mit dem analogen StarGate-Vektor eine translationsoptimierte ribosomale Bindestelle enthält (rbs3a).

II.1.5 Medien

II.1.5.1 *E. coli* Medien

Alle Stammlösungen (SL) und Medien wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltration (0,2 µm) sterilisiert. Je nach Stamm wurden Antibiotika zugesetzt: 25–50 µg·mL⁻¹ Carbenicillin (SL 100 mg·mL⁻¹; übliche Konzentration: 50 µg·mL⁻¹; Verringerung lediglich bei pAmp.RSF-Konstrukten); 50 µg·mL⁻¹ Kanamycin (SL 100 mg·mL⁻¹); 50 µg·mL⁻¹ Spectinomycin (SL 50 mg·mL⁻¹); 34 µg·mL⁻¹ Chloramphenicol (SL 50 mg·mL⁻¹). Feste Medien wurden durch Zugabe von 15 g·L⁻¹ Agar zu den Basis-Medien hergestellt.

LB (Lysogenic Broth) Medium

10 g·L⁻¹ Trypton, 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g·L⁻¹ NaCl; pH 7,0 (autoklaviert)

M9 Minimal Medium

6 g·L⁻¹ Na₂HPO₄; 3 g·L⁻¹ KH₂PO₄; 1 g·L⁻¹ NH₄Cl; 0,5 g·L⁻¹ NaCl (M9 Salze, als 5x SL, autoklaviert); 1 mM MgSO₄ (1000x SL, autoklaviert); 0,1 mM CaCl₂ (1000x SL, autoklaviert); 1 mM Thiamin-HCl (1000x SL, sterilfiltriert); 50 µM FeSO₄ (400x SL, sterilfiltriert)

Addition nach Bedarf: 0,05–1% (w/v) Glucose (SL 40% (w/v)); 0,2–0,8% (w/v) Lactose (SL 10% (w/v)); 1–5% (v/v) Glycerin (SL 50% (v/v)); 50–200 µM Fe(III)-NH₄-Citrat (SL 100 mM); 1–100 µM NiCl₂ (SL 100 mM); 0,5–2 µM Riboflavin (als Feststoff); Aminosäure-Mix (als Feststoffe abgewogen; 1 mM je AS); 5–15% (v/v) LB-Medium – alle SL sterilfiltriert bis auf Glycerin (autoklaviert)

Supplementation unter „optimierten Bedingungen“: 0,1% (w/v) Glucose; 0,8% (w/v) Lactose; 2% (v/v) Glycerin; 100 µM Fe(III)-NH₄-Citrat; 1 µM NiCl₂; 1 µM Riboflavin; 5% (v/v) LB-Medium

HEM (*Hydrogenase expression modified*) Komplexmedium

10 g·L⁻¹ Trypton, 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt (LB-Basis ohne NaCl, autoklaviert); 50 mM Na₂HPO₄; 50 mM KH₂PO₄; 12,5 mM (NH₄)₂SO₄ (Phosphat-Basis, als 20x SL, autoklaviert)

Addition nach Bedarf: 50 µM CaCl₂; 25 µM ZnSO₄; 5 µM CoCl₂; 5 µM CuSO₄ (Spurenelemente; als 200x SL in 60 mM HCl, sterilfiltriert); 0,05–1% (w/v) Glucose (SL 40% (w/v)); 0,2–0,8% (w/v) Lactose (SL 10% (w/v)); 1–5% (v/v) Glycerin (SL 50% (v/v)); 50–200 µM Fe(III)-NH₄-Citrat (SL 100 mM); 1–25 µM NiCl₂ (SL 100 mM); 0,5–2 µg·L⁻¹ Riboflavin (als Feststoff) – alle SL sterilfiltriert bis auf Glycerin (autoklaviert)

LB-AN (Anaerob) Medium

10 g·L⁻¹ Trypton, 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g·L⁻¹ NaCl; 100 mM MOPS/KOH pH 7,2 (MOPS-LB Basis, autoklaviert)

Additionen nach Bedarf: 0,4–0,8% (w/v) Glucose (SL 40% (w/v)); 2 mM Cystein (SL 100x); 25–100 µM FeSO₄ oder 100 µM Fe(III)-NH₄-Citrat (SL 100 mM); 25 µM NiCl₂ (SL 100 mM); 50 µM CaCl₂; 25 µM ZnSO₄; 5 µM CoCl₂; 5 µM CuSO₄ (Spurenelemente; als 200x SL in 60 mM HCl, sterilfiltriert); 0,2–1 mM IPTG (SL 500 mM) – alle SL sterilfiltriert bis auf Glycerin (autoklaviert)

II.1.5.2 *Cupriavidus necator* Medien

Alle Stammlösungen (SL) und Medien wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltration (0,2 µm) sterilisiert. Feste Medien wurden durch Zugabe von 15 g·L⁻¹ Agar zu den Basis-Medien hergestellt.

Basis-Minimalmedium nach Schlegel (1961)

2,6 g·L⁻¹ KH₂PO₄; 3,2 g·L⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O (Puffer-Basis, pH 6,8, autoklaviert); 1 g·L⁻¹ NH₄Cl (SL 100x, autoklaviert); 0,5 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O (SL 100x, autoklaviert); 0,5 g·L⁻¹ NaHCO₃ (SL 100x, autoklaviert); 0,01 g·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O (SL 100x, autoklaviert); 5 mg·L⁻¹ Fe(III)NH₄Citrat (SL 1000x, sterilfiltriert)

Additionen nach Bedarf: 2–4% (w/v) Fructose (SL 20% (w/v)); 2% (v/v) Glycerin (SL 50% (v/v)); 0,5 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 0,15 mg·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 1,5 mg·L⁻¹ Borsäure; 1 mg·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O; 50 µg·L⁻¹ CuCl₂·2H₂O; 0,1 mg·L⁻¹ NiCl₂·6H₂O; 0,15 mg·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O (Spurenelemente SL6-Lösung, 200x) – alle SL sterilfiltriert bis auf Glycerin (autoklaviert)

FN/FGN-Minimalmedium (F = Fructose; G = Glycerin; N = Stickstoff)

2,3 g·L⁻¹ KH₂PO₄; 2,9 g·L⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O (Puffer-Basis, pH 6,8, autoklaviert); 1–4 g·L⁻¹ NH₄Cl (SL 100x, autoklaviert); 0,5 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O (SL 100x, autoklaviert); 0,5 g·L⁻¹ NaHCO₃ (SL 100x, autoklaviert); 0,01 g·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O (SL 100x, autoklaviert); 5–50 mg·L⁻¹ Fe(III)NH₄Citrat (SL 100x, sterilfiltriert)

Additionen nach Bedarf: 2–4% (w/v) Fructose (SL 20% (w/v)); 2–4% (v/v) Glycerin (SL 50% (v/v)); 0,5 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 0,15 mg·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 1,5 mg·L⁻¹ Borsäure; 1 mg·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O; 50 µg·L⁻¹ CuCl₂·2H₂O; 0,15 mg·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O (Spurenelemente SL6-Lösung ohne Nickel, 200x); 1 µM NiCl₂·6H₂O (SL 100 mM); 1 µM ZnSO₄·7H₂O (SL 1 mM); 1–10 µM EDTA (SL 10 mM) – alle SL sterilfiltriert bis auf Glycerin (autoklaviert)

Supplementation unter „optimierten Bedingungen“: **Kulturstart (Phase I):** Basis-FN Medium mit 4% (w/v) Fructose ohne Glycerin und ohne NaHCO₃; 2 g·L⁻¹ NH₄Cl; 50 mg·L⁻¹ Fe(III)NH₄Citrat; 1 µM NiCl₂; **Nach 24 h (Phase II):** Zugabe 4% (v/v) Glycerin und nochmals 1 g·L⁻¹ NH₄Cl

II.1.6 Lösungen und Puffer

AP1 – Basispuffer 1 für Affinitätsreinigung

50 mM KPi pH 7,0

AP2 – Basispuffer 2 für Affinitätsreinigung

100 mM Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM KCl

A1 – Aufschlusspuffer 1 für Affinitätsreinigung

50 mM KPi pH 7,0 + 5 mM MgCl_2 + 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase I + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase A + 25 $\mu\text{g}\cdot(\text{g Zellen})^{-1}$ Avidin

A2 – Aufschlusspuffer 2 für Affinitätsreinigung

100 mM Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM KCl + 5 mM MgCl_2 + 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase I + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase A + 25 $\mu\text{g}\cdot(\text{g Zellen})^{-1}$ Avidin

AH – Hydrogenase-Aufschlusspuffer 1

50 mM KPi pH 7,0 + 5 mM MgCl_2 + 50 mM Na-Succinat + 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase I + 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase A + 2 μM FMN (+ 25 $\mu\text{g}\cdot(\text{g Zellen})^{-1}$ Avidin \leftarrow Affinitäts-Reinigung)

AE1 – Elutionspuffer 1 für Affinitätsreinigung

50 mM KPi pH 7,0 + 2,5 mM D-Desthiobiotin (+ 2 μM FMN)

AE2 – Elutionspuffer 2 für Affinitätsreinigung

100 mM Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM KCl + 2,5 mM D-Desthiobiotin

AR – Regenerationspuffer für Affinitätsmatrix

100 mM Tris/HCl pH 8,0 + 150 mM KCl + 1 mM HABA

DEAE-A – Ionentauscher Niedrigsalzpuffer

50 mM KPi pH 7,0 + 2 μM FMN

DEAE-B – Ionentauscher Hochsalzpuffer

50 mM KPi pH 7,0 + 2 μM FMN + 1,5 M KCl

Hydrogenase Assay Puffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

40 mM Tris + 20 mM Essigsäure + 1 mM EDTA

Basispuffer für zellfreie Reifungsversuche (ZFM) mit Extrakten

50 mM Tris/HCl pH 8,0 / 50 mM MOPS/KOH pH 7,0 / 50 mM KPi pH 7,0 (alle Puffer + 5 mM MgCl₂)

SDS-PAGE Laufpuffer

0,3% (w/v) Tris + 1,44% (w/v) Glycin + 0,1% (w/v) SDS

2x SDS-PAGE Ladepuffer

125 mM Tris/HCl pH 6,8 + 4% (w/v) SDS + 20% (v/v) Glycerin + 0,2% (w/v) Bromphenolblau + 20 mM DTT

Coomassie Färbelösung

47,5% (v/v) Ethanol + 10% (v/v) Essigsäure + 0,1% (w/v) Serva Blue R-250

Coomassie Entfärber 1

40% (v/v) Ethanol + 10% (v/v) Essigsäure

Coomassie Entfärber 2

20% (v/v) Ethanol + 10% (v/v) Essigsäure

Western Blot Transferpuffer

1,87 g·L⁻¹ Glycin + 1,5 mL·L⁻¹ Triethanolamin + 20% (v/v) Methanol + 1 g·L⁻¹ SDS

PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

4 mM KH₂PO₄ + 16 mM Na₂PO₄ + 115 mM NaCl

PBS-T (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20)

4 mM KH₂PO₄ + 16 mM Na₂PO₄ + 115 mM NaCl + 0,1% (v/v) Tween 20

Western-Blot Blockierungspuffer

PBS + 0,5% (v/v) Tween 20 + 1 g·L⁻¹ BSA

Western-Blot ECL-Detektionslösung

100 mM Tris/HCl pH 8,6 + 0,22% (v/v) p-Coumarinsäure-Lösung^a + 0,5% (v/v) Luminol-Lösung^b + 0,03% (v/v) HRP-Substratlösung^c
[^a 90 mM p-Coumarinsäure/DMSO; ^b 250 mM Luminol/DMSO; ^c 30% (w/v) H₂O₂]

TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung)

10 mM Tris/HCl pH 8,0 + 9,2 mM HCl + 150 mM NaCl

II.2 Mikrobiologische Methoden

II.2.1 Anzucht *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* Stämmen zur Plasmidpräparation oder als Starterkulturen aus Glycerinstocks erfolgte in Reagenzröhrchen (2–4 mL LB-Medium) unter aeroben Bedingungen bei 37 °C und 500 UpM über Nacht. Zur Präparation von Glycerinstocks wurden 600 µL einer „log“-Kultur (OD_{578} zwischen 0,4 und 0,8) 1:1 (v:v) mit 50% (v/v) Glycerin (steril) gemischt und in 1,5 mL sterilen Eppendorfgefäßen bei -80 °C gelagert.

II.2.1.1 Genexpression unter $P_{\text{Tetracyclin}}$ -Kontrolle

Zur Genexpression unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotors (pASG-Derivate) wurden 1 Liter Schikane-Kulturkolben (500 mL Kultur) bzw. 1,5 mL Eppendorfgefäße (650 µL Volumen) eingesetzt. Die Kulturen wurden hierzu am Tag der Induktion 1:50 (v:v) aus Vorkulturen inokuliert und bei 37 °C und 300–400 UpM geschüttelt. Induziert wurde bei einer optischen Dichte (OD_{578}) von 0,6 durch Zugabe von 200 ng·mL⁻¹ Anhydrotetracyclin (AHT) für 3 Stunden unter Lichtausschluss. Die Zellen wurden anschließend geerntet und bis zur Verwendung bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

II.2.1.2 Genexpression unter P_{T7} -Kontrolle

Zur Expression T7-kontrollierter Gene kamen ausschließlich *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLysE bzw. *E. coli* BL21Star™ (DE3) zum Einsatz. Das hierbei eingesetzte Kulturvolumen reichte von 3 mL (Reagenzröhrchen) bis 2 L (Fermenter).

II.2.1.2.1 IPTG-Induktion

Plasmide mit Genen unter P_{T7} -Kontrolle wurden neben der Restriktionsanalyse einer Funktionalitätsanalyse *in vivo* unterzogen. Transformanden wurden hierzu ü. N. bei 37 °C angezogen. Am Induktionstag wurden 3 mL LB-Medium inklusive Antibiotika (Reagenzröhrchen) 1:50 (v:v) mit der Vorkultur beimpft und für eine Stunde zur Adaption bei 37 °C und 500 UpM geschüttelt. Die Induktion wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet. Die Zellen wurden nach 4 h geerntet und für die SDS-PAGE Analyse vorbereitet.

II.2.1.2.2 Autoinduktion

Standardverfahren: Zur Vorbereitung der Hauptkulturen wurden Vorkulturen aus Glycerinstocks beimpft und in LB-Medium unter Zusatz der Selektionsantibiotika bei 37 °C über Nacht geschüttelt (Reagenzröhrchen mit 3–4 mL oder 500 mL Schikanekolben mit 50–100 mL Arbeitsvolumen). Für die Produktion von rekombinanten Proteinen oder Komplexen (Ausnahme: SH; siehe unten) kam überwiegend LB-Medium, alternativ M9 Minimalmedium oder HEM-Medium unter Zusatz der Selektionsantibiotika sowie der jeweils benötigten Supplemente zum Einsatz. Die supplementierten Medien wurden zu Kultivierungsstart 1:25–1:50 (v:v) aus den jeweiligen Vorkulturen beimpft und bis zur Ernte bei 150–350 UpM geschüttelt. Die Kultivierungszeit und -temperatur sowie Schüttelrate wurde variiert und vielfach für einzelne Anwendungsfälle optimiert: Kultivierungstemperaturen lagen bei 18 °C, 22–25 °C (RT), 30 °C oder 37 °C, und Induktionszeiträume zwischen 20 und 48 h wurden gewählt.

Für die kombinierte Induktion (Tet- und T7-kontrollierte Expression) wurde wie zuvor beschrieben autoinduziert, jedoch wurde der Induktor Anhydrotetracyclin (AHT; Konzentration 200 ng·mL⁻¹) nach 12–16 h hinzugefügt und die Kultivierung unter Lichtausschluss bis zum Ende der Autoinduktion fortgeführt.

Spezielles Verfahren für SH-Produktion: Zur optimierten Produktion rekombinanter SH Varianten kam ein modifiziertes Verfahren zum Einsatz. Die Vorkultur wurde in optimiertem M9-Medium (Abschnitt II.1.5.1) ohne Laktose (!) aus Glycerinstocks inokuliert (500 mL Schikanekolben mit 50–100 mL Arbeitsvolumen) und ü. N. bei 25–28 °C (300 UpM) angezogen. Die Induktionskultur (1000 mL Schikanekolben mit 550 mL Arbeitsvolumen) wurde Tags darauf aus der Vorkultur, deren OD₅₇₈ einen Wert von 0,8–1 nicht überschritt, zu einer Start-OD₅₇₈ von 0,1 inokuliert. Hierzu wurde das kalkulierte Volumen der Vorkultur entnommen, bei 2,000 g für 2 min sedimentiert, in sterilem Medium wieder aufgenommen und mit dem Induktionsmedium vereinigt. Die Induktionskultur wurde bei RT (ca. 22–25 °C) und 200 UpM für 36–40 h geschüttelt und anschließend geerntet.

II.2.1.3 Anzucht im 2 Liter Fermenter

Für Fermentationen kam ein 2 Liter Biostat[®]-B Plus Modell (Sartorius) zum Einsatz. Produktion der rekombinanten SH erfolgte ausschließlich in Batch-Fahrweise mittels Autoinduktion in M9-Minimal-, oder HEM-Medium mit variablen Supplementationen. Der Reaktor wurde mit 1,5 Liter Startvolumen betrieben. Nicht autoklavierbeständige Medienkomponenten, Antibiotika und Antischaum-Mittel wurden über einen aseptischen

Animpfstutzen mittels steriler Kanülen zugegeben. Die Vorkultur wurde über das Pumpensystem zugeführt [Inokulationsdichte 1:50 (v:v)]. Der pH-Wert wurde *online* aufgenommen und per Titration (H_3PO_4 , KOH) auf pH 7,0 geregelt. Die Kultur wurde kontinuierlich mit Druckluft (Volumen variabel) begast und die Sauerstoffsättigung mittels pO_2 Sonde erfasst. Begasungsrate, Rührerdrehzahl und Temperatur wurden bei verschiedenen Fermentationen und meistens ebenso innerhalb eines Batch-Versuchs variiert, um den verschiedenen Anforderungen der Proteinsynthese, Reifung und SH-Stabilisierung im Rahmen der Produktionsoptimierung Rechnung zu tragen. Proben zur Messung der OD und Bestimmung der SH-Aktivität wurden alle 0,5–4 Stunden mittels Probenschleife genommen.

II.2.1.4 Anaerobe Anzucht

Zur anaeroben Anzucht von *E. coli* Expressionsstämmen kamen 2 Liter Schottflaschen zum Einsatz. Die Flaschen wurden hierzu mit 1–1,2 Liter LB-AN-Medium beschickt und autoklaviert. Anschließend wurde jede Flasche mit sterilem gasdichten Silikonstopfen verschlossen, welcher mit einem Metall-Abdichtring und einem nach oben offenen Schraubdeckel fixiert wurde. Die benötigten Selektionsantibiotika und Supplemente wurden unter Rühren zugegeben und das fertige Medium 1:25 (v:v) mit der Vorkultur inokuliert. Unter Einsatz zweier Kanülen wurde über den Stopfen ein Druckausgleich geschaffen und die in der Flasche vorhandene Atmosphäre für 15 min bei leichtem Rühren komplett durch Stickstoff ausgetauscht. Anschließend wurden die Kulturen für 2 Stunden zur Adaption sowie zum Verbrauch von gelöstem Restsauerstoff bei 200 UpM und 30 °C gerührt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG zur Kultur erfolgte die Induktion, welche für weitere 20–24 h bei oben genannten Bedingungen, jedoch 150 UpM vollzogen wurde.

II.2.2 Anzucht *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator wurde gemäß Angaben der DSMZ in Kultur gebracht und die Glycerinstocks analog dem in II.2.1 beschriebenen Vorgehen präpariert. Die Anzucht erfolgte bei RT oder 30 °C. Eingesetzte Kulturvolumina reichten von 4 mL (Reagenzröhrchen; Vorkultur) bis 2 Liter (Fermenter). Zum Einsatz kamen modifizierte Minimalmedien für Kultivierungen unter heterotrophen, „Hydrogenase-dereprimierenden“ Bedingungen ([214,217] und Abschnitt II.1.5.1).

II.2.2.1 Anzucht im Schüttelkolben

Die Anzucht von *C. necator* im Kleinmaßstab erfolgte in 1 L bzw. 250 mL Schüttelkolben (Arbeitsvolumina 200 bzw. 50 mL) bei 30 °C und 200–350 UpM. Dazu kamen verschiedene Modifikationen des heterotrophen Minimalmediums zum Einsatz. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Medien 1:50 (v:v) aus 2–3 Tage geschüttelten, mittstationären Vorkulturen beimpft und bei einer optischen Dichte (OD₄₃₆; II.2.3) zwischen 11–14 geerntet.

II.2.2.2 Anzucht im 2 Liter Fermenter

Die Anzucht von *Cupriavidus necator* im Fermenter erfolgte analog II.2.1.3 unter Einsatz modifizierter Minimalmedien.

II.2.3 Bestimmung der Zelldichte und Umrechnungen

Zur Bestimmung der Zelldichte einer laufenden Kultur kam die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm (*E. coli*) bzw. 436 nm (*C. necator*) zum Einsatz. Extinktionen zwischen 0,05 und 0,3 wurden als valide Werte angenommen. Für exponentiell wachsende *E. coli* wurden folgende Umrechnungsmöglichkeiten zugrunde gelegt:

$$\text{OD}_{578} = 1 \approx 1 \cdot 10^9 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1} \approx 1 \text{ g(Zellfeuchtmasse)} \cdot \text{L}^{-1} \quad (\text{Gleichung 4})$$

II.2.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Ultrakompetente *E. coli* wurden nach einem etablierten Protokoll hergestellt [303]. Kompetenzen lagen bei $2 \cdot 10^9 \text{ CFU} \cdot (\mu\text{g pENTRY Plasmid})^{-1}$ für *E. coli* DH5 α , $1 \cdot 10^8 \text{ CFU} \cdot (\mu\text{g pENTRY Plasmid})^{-1}$ für *E. coli* BL21Star (DE3) sowie $5 \cdot 10^7 \text{ CFU} \cdot (\mu\text{g pENTRY Plasmid})^{-1}$ für *E. coli* Rosetta (DE3) pLysE. Die sequentielle Transformation mehrerer Plasmide erfolgte ab dem zweiten Plasmid mittels TransformAid Bacterial Transformation Kit (Abschnitt II.3.6.2).

II.3 Molekularbiologische & gentechnische Methoden

II.3.1 Isolierung und Reinigung von DNS

Die Isolierung und Reinigung von DNS aus Bakterien erfolgte mit Kits gemäß Herstellerangaben. Genomische DNS aus *C. necator* wurde mittels GenElute™ Bacterial

Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich) präpariert. Zur Plasmidpräparation aus *E. coli* kam das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) zum Einsatz. PCR-Produkte und linearisierte Vektoren wurden unter Einsatz des GeneJET™ PCR Purification Kits (Fermentas) gereinigt.

II.3.2 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle von DNS-Proben erfolgte mittels NanoDrop ND-1000 Photometer (Thermo Fisher Scientific) mit 2 µL Probenvolumen gemäß Herstellerangaben.

II.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die *Polymerase chain reaction* (PCR) wurde zur Amplifikation von Genen oder Genfragmenten sowie zur Synthese des linearen Vektorrückgrats (II.3.4.1) eingesetzt. Durch Einsatz spezifischer Primer mit jeweils endständigen Sequenzen wurden Amplifikate für weitere Klonierungsschritte vorbereitet. Bei Bedarf wurden zusätzlich stille Mutationen eingefügt, um klonierungsrelevante Restriktionsschnittstellen zu entfernen und/oder den GC-Gehalt zur erleichterten Primeranlagerung herabzusetzen. Als Extensionsenzym in dieser Arbeit wurde Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Die Ansätze (100 µL) enthielten 10–100 ng DNS-Matrize (*template*) abhängig davon, ob genomische oder Plasmid-DNS als Vorlage diente, 0,5 µM je Primer, 5x HF- oder GC-Puffer (incl. MgCl₂), 0,25 mM dNTPs und 1 U Phusion® Polymerase. Bei deutlich erschwerten Amplifikationen (hoher GC-Gehalt, u. ä.) wurden zusätzlich 10–30% (v/v) PCRx Enhancer Solution (Invitrogen) zugesetzt und die Primer-Anlagerungs- (*Annealing*) –Temperatur entsprechend herabgesetzt.

Die Reaktionen folgten einem standardisierten Temperaturprogramm: Die *template*-DNS wurde initial für 5 min bei 98 °C denaturiert. Anschließend folgte ein 30 Zyklen umfassendes Programm, wobei jeder Zyklus aus Denaturierung (10 s, 98 °C), Primer-Anlagerung (*annealing*, 20 s, variable Temperatur) und Primer-Verlängerung (*extension*, 30 s/kb, 72 °C) bestand. Eine finale „Auffüllreaktion“ (5 min, 72 °C) schloss das Programm ab.

5 µL der Ansätze wurden anschließend 1:5 mit sterilem VE-Wasser verdünnt und mittels MultiNA-Chipelektrophorese analysiert. Amplifikate mit korrekter Größe wurden mittels GeneJET™ PCR Purification Kits (Fermentas) gereinigt (II.3.1), quantifiziert (II.3.2) und für weitere Schritte eingesetzt (II.3.4 / II.3.5).

II.3.4 Vektorsynthese

II.3.4.1 pFxT7-Fusionsvektoren

Als Rückgrat für die Konstruktion der modifizierten pFxT7 Fusionsvektoren dienten die pFF.rbs3a-, bzw. pFF.c-Derivate pFn1 und pFc1. Die pPSG-Vektoren, welche zusätzlich die Möglichkeit der N- und C-terminalen StrepII-Fusionierung boten, dienten als Matrizen zur Amplifikation der T7-Kassetten.

Sowohl die designierten *Upstream*- (pFnT7-Derivate) als auch *Downstream*-Vektoren (pFcT7-Derivate) sollten mit der Möglichkeit zur N-, bzw. C-terminalen StrepII-Tag Fusion ausgestattet werden. Pro Basisvektor (pFn1 und pFc1) wurden daher drei T7-Kassetten ausgehend von pPSG-wt, pPSG-3 bzw. pPSG-5 via PCR (II.3.3) amplifiziert. Dabei kamen die Primerpaare T7cas-pFn-s & T7cas-pFn-as sowie T7cas-pFc-s & T7cas-pFc-as zum Einsatz (Tabelle VI.1). Die Produkte wurden gereinigt (II.3.1), analysiert (II.3.9) und verbliebene Template-Vektoren mit *DpnI* geschnitten (II.3.7). Nach erneuter Reinigung wurden die Amplifikate mittels Ein-Schritt-Reaktion (*LguI*-in; II.3.5.2) in pFn1 bzw. pFc1 eingebaut. Im Weiteren wurde gemäß Standardprotokoll verfahren (II.3.1 / II.3.2 / II.3.6.1 / II.3.7 / II.3.9 / II.3.10). Da die T7-Kassetten aus den pPSG-Derivaten das lacP/Z Operon beinhalten, konnten Transformanden zusätzlich mittels Blau/Weiß Screen visualisiert werden.

II.3.4.2 Kompatible Expressionsvektoren

Die Vektoren pAmp.RSF.3a (Amp^R, RSF ori) and pSm.CDF.3a (Sm^R, CDF ori) wurden ausgehend von den Duet-Vektoren (Novagen) neu moduliert. Ziel war es, kompatible Vektoren zu dem bereits vorhandenen pENTRY (Kan^R, ColE1 ori) Vektor zu generieren. Dazu mussten zusätzliche Basiseigenschaften hinzugefügt werden, um Kompatibilität mit der innerhalb dieser Arbeit eingesetzten Klonierungstechnologie zu erreichen. Zusätzlich sollten diese Vektoren als *Esp3I*-in Konstrukte fungieren, um Transfer ausgehend von ENTRY-Konstrukten zu ermöglichen. Als Basis der Vektoren dienten jeweils mehrere Module, welche via PCR (II.3.3) ausgehend von den Duet-Vektoren sowie pFF.rbs3a und pENTRY amplifiziert wurden.

Zur Konstruktion des pAmp.RSF Basisvektors wurden folgende Fragmente, jeweils mit endständigen *LguI*-Erkennungssequenzen, amplifiziert: der RSF ori wurde ausgehend von pRSFDuet-1 mittels der spezifischen Primer RSF-ori-s und lacI-as isoliert. Für die Amplifikation von Blue GCAC wurde pENTRY als Matrize, sowie die Primer Blue-GCAC-s und Blue-GCAC-as eingesetzt. Das dritte Assemblierungsfragment, T7term, wurde ausgehend

von pACYC-Duet-1 mittels der Primer T7term-s und T7term-as generiert. Die Amp/Carb Resistenzkassette wurde schließlich mit den Primern AmpR-s and AmpR-as ausgehend von pFFrbs3a amplifiziert (Primer: Tabelle VI.1). Die vier Fragmente wurden gereinigt, *DpnI*-geschnitten und analysiert (II.3.1 / II.3.2 / II.3.6.1 / II.3.7 / II.3.9). Anschließend erfolgte die Assemblierung in einer Ein-Schritt-Reaktion mittels *LguI* und T4-Ligase (II.3.5.2). Der resultierende Vektor pAmp.RSF(blue) wurde isoliert (II.3.1 / II.3.2 / II.3.6.1 / II.3.7 / II.3.9). Zur zusätzlichen Einfügung divergenter *Esp3I*-in Erkennungssequenzen wurde der Vektor folgendermaßen modifiziert:

Die Oligonukleotide *LguI*(out).3a-s und *LguI*(out).3a-as wurden zunächst phosphoryliert (PNK, siehe II.3.5.1). Unter Zusatz von PCRx Enhancer Solution (Invitrogen) wurden die Oligos anschließend hybridisiert (*annealing*), in dem sie auf 95 °C erhitzt und dann langsam (Wasserbad) abgekühlt wurden. Das Produkt wurde anschließend gereinigt (II.3.1), analysiert (II.3.9) und mittels *LguI*-in Transfer (II.3.5.2) in pAmp.RSF(blue) transferiert, resultierend in pAmp.RSF.3a(white), welcher *Esp3I*-in Erkennungssequenzen aufwies. Der Vektor wurde anschließend erneut „gefärbt“, in dem eine der in II.3.4.1 amplifizierten T7-Kassetten via *Esp3I*-in Transfer (II.3.5.3) ohne Veränderung der Aufnahmesequenz eingefügt wurde.

Die analoge Prozedur wurde für Vektor pSm.CDF.3a angewendet, wobei folgende Ausgangsfragmente amplifiziert wurden: der CDF ori aus pCDFDuet-1 mit den Primern CDF-ori-s und lacI-as; das Blue GCAC Fragment wie zuvor beschrieben; das Fragment mit der Sm^R Kassette SmR-T7term ebenfalls aus pCDFDuet-1 mit den Primern T7term-s und SmR-as (Primer: Tabelle VI.1). Die Assemblierung, Einfügung der divergenten *Esp3I*-in Erkennungssequenzen und abschließende lacP/Z Insertion erfolgte wie für pAmp.RSF.3a beschrieben.

II.3.5 Genklonierung

Die Klonierungstechnologie, welche in dieser Arbeit zum Einsatz kam, basierte auf der Arbeit von Pinkenburg und Selmer [304], aus welcher auch die StarGate[®] Technologie (IBA) hervorging. Vektoren, die *de novo* synthetisiert wurden (II.3.4) sowie Genfragmente (II.3.3) zur späteren Fusions- und Transferklonierung wurden gleichermaßen so präpariert, dass sie innerhalb der beiden alternierenden Transferschritte eingesetzt werden konnten, welche in Tabelle II.3 zusammengefasst sind.

Tabelle II.3 – Ansätze der Haupt-Transferreaktionen für Klonierungsprozeduren in dieser Arbeit.

	Komponente	Gehalt	<i>LguI</i> -Fusionierung	<i>Esp3I</i> -Transfer
Plasmide	<i>LguI</i> -in-Akzeptorvektor	25–50 ng	x	
	<i>Esp3I</i> -in-Akzeptorvektor	25–50 ng		x
	<i>Upstream</i> -Fusionskonstrukt	50–500 ng*	x	
	<i>Downstream</i> -Fusionskonstrukt		x	
	ENTRY-Konstrukt			x
weitere Komponenten	10x Tango-Puffer	1x	x	x
	10 mM DTT	1 mM	x	x
	10 mM ATP	0,5 mM	x	x
	<i>LguI</i>	5 U	x	
	<i>Esp3I</i>	10 U		x
	T4-DNS Ligase	2 U	x	x
	VE-Wasser steril	ad 50 µL	x	x
Temperatur	30 °C	-	x	
	37 °C	-		x

* Die Menge Donorvektor(en), die eingesetzt wurde, richtete sich nach der Größe des Transferprodukts und wurde so gewählt, dass sich ein 1:1 molares Verhältnis zum Akzeptor ergab.

II.3.5.1 *Blunt*-Insertion der Amplifikate in pF (linear)

Cn Gene wurden abhängig von der Sequenzlänge und zusätzlichen Faktoren (z. B. Einfügen stiller Mutationen) entweder als komplette ORFs oder fragmentiert amplifiziert (Tabelle III.1). Die daraus resultierenden 34 Amplifikate (Gene und Fragmente) wurden via PCR (II.3.3) mit spezifischen Primern (Tabelle VI.1) und genomischer *Cn* DNS (II.3.1) als Matrize generiert. Als Akzeptorvektor diente das lineare Rückgrat eines Fusionsvektors (pFF.rbs3a), welches ebenfalls via PCR und mit den Primern pFF(for) bzw. pFF(rev) amplifiziert wurde.

Die 34 PCR-Produkte wurden gereinigt (II.2.1), mit Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert und wie auch der pF(linear) Akzeptorvektor einer anschließenden erneuten Reinigung unterzogen (II.3.1). Unter Einsatz von PEG, T4-Ligase-Puffer und 2 U T4 DNS-Ligase erfolgte anschließend die *Blunt End* Ligation der Inserts in pF(linear) (20 µL Gesamtvolumen bei 22 °C für 1 h). Das molare Verhältnis von Insert zu Akzeptor lag bei 3:1–10:1. 5 µL des Ansatzes wurden anschließend in *E. coli* DH5α transformiert (II.3.6.1). Es folgte das standardisierte weitere Verfahren (II.3.1 / II.3.2 / II.3.6.1 / II.3.7 / II.3.9 / II.3.10).

II.3.5.2 Transfer/Fusionierung in *LguI*-in Vektoren

Zwei Arten von *LguI*-in Transferreaktionen wurden innerhalb dieser Arbeit angewandt, wobei es sich in allen Fällen um Transfer in pENTRY(blue) handelte: i) Der Transfer bzw. die

Fusionierung von pF(Blunt)-Fragment/Gen Konstrukten aus II.3.5.1 und ii) die klassische Fusionierung von ORFs mittels Fusionsvektoren pFF.rbs3a (*Upstream*) und pFF.c (*Downstream*) zur Generierung polycistronischer Operons oder: die Fusionierung von monocistronischen Genkassetten (ORFs mit eigenem T7-Promotor- und Terminator) mittels Fusionsvektoren pFnT7 (*Upstream*) bzw. pFcT7 (*Downstream*). In allen Fällen handelte es sich um Ein-Schritt-Reaktionen mit 1–3 verschiedenen Donorvektoren und pENTRY als Akzeptorvektor (Tab. II.3). Die korrekte Assemblierung wurde durch die Überhänge determiniert, welche zu Klonierungsbeginn festgelegt und durch *LguI*-Aktivität während der Reaktion freigelegt wurden, so dass die Bildung von Fehlprodukten gemäß Schlüssel-Schloss-Prinzip ausgeschlossen werden konnte. *LguI*-in Reaktionen erfolgten in 50 µL Gesamtvolumen bei 30 °C für 1–5 h. 5 µL des Ansatzes wurden anschließend in *E. coli* DH5α transformiert (II.3.6.1). Anschließend folgte das standardisierte weitere Verfahren (II.3.1 / II.3.2 / II.3.6.1 / II.3.7 / II.3.9).

II.3.5.3 Subklonierung in *Esp3I*-in Vektoren

Esp3I-in Subklonierungen beinhalteten alle Schritte, in welchen ein Insert aus einem pENTRY-Konstrukt in einen geeigneten Akzeptor transferiert werden sollte. Akzeptoren waren hierbei Fusionsvektoren (pFF.rbs3a, pFF.c, pFnT7, pFcT7), klassische StarGate® Expressionsvektoren (pASG, pPSG) oder *de novo* synthetisierte, zu pENTRY kompatible Expressionsvektoren (pAmp.RSF.3a, pSm.CDF.3a). *Esp3I*-in Reaktionen erfolgten in 50 µL Gesamtvolumen bei 37 °C für 1–3 h. 5 µL des Ansatzes wurden anschließend in *E. coli* DH5α transformiert (II.3.6.1). Anschließend folgte das standardisierte weitere Verfahren (II.3.1 / II.3.2 / II.3.6.1 / II.3.7 / II.3.9). Bei Plasmiden mit RSF-Replikationsursprung wurde die jeweils halbe Antibiotika-Konzentration innerhalb des Agar-LB-Mediums eingesetzt. Zusätzlich wurden den jeweiligen Medien 0,2% (w/v) Glucose zugesetzt.

II.3.6 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

II.3.6.1 Hitzeschock-Transformation

Die gemäß II.2.4 hergestellten chemisch kompetenten Zellen wurden wie folgt transformiert: Die benötigte Anzahl Aliquots wurde auf Eis aufgetaut. Für die Transformation von 70 µL Zellen wurden entweder 5 µL des Ligationsansatzes aus II.3.5 oder im Falle der Transformation in Expressionsstämme (BL21Star™ oder Rosetta™ pLysE) 50–150 ng Plasmid-DNS in 1,5 mL Eppendorfgefäßen auf Eis vorgekühlt. 70 µL der aufgetauten Zellen

wurden anschließend mit den jeweiligen DNS-Proben gemischt und für 15–20 min auf Eis belassen, gefolgt von einem kurzen Hitzeschock-Intervall bei 42 °C für 25–30 s und erneuter Kühlung auf Eis. Im Falle von Ligationsansätzen wurden 1 mL LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Transformanden zur Aneignung der Antibiotikaresistenz (Kan, Cam, Sm) für 1 h bei 37 °C und 1300 UpM geschüttelt. Für optimale Vereinzelung (ca. 200 CFU·Platte⁻¹) reichten 20–50 µL der verdünnten Zellsuspension zur Ausplattierung. Im Falle von Amp/Carb-Resistenzen entfiel der einstündige Inkubationsvorgang vor der Ausplattierung. Platten wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Wurden gereinigte Plasmide zur Generierung von Expressionsstämmen in *E. coli* BL21Star™ (DE3) bzw. Rosetta™ (DE3) pLysE transformiert, war die Vorgehensweise die gleiche. In diesem Fall wurden die Transformanden jedoch nicht vereinzelt, sondern direkt in LB-Flüssigmedium transferiert, bei 37 °C ü. N. (500 UpM) inkubiert und am folgenden Tag zur Genexpression eingesetzt.

II.3.6.2 Transformation mittels TransformAid-Kit

Das TransformAid Kit (Fermentas) wurde zur sequentiellen Transformation mehrerer Plasmide in *E. coli* eingesetzt. Für das jeweils erste Plasmid wurde gemäß II.3.6.1 vorgegangen. Je zwei Klone wurden im Anschluss per Expression getestet (vgl. Abschnitt II.3.1.2.1) und bei positivem Ergebnis für die Einschleusung des zweiten Plasmids eingesetzt. Dazu wurde gemäß Herstellerangaben verfahren. Bei Plasmiden mit RSF-Replikationsursprung wurde die jeweils halbe Antibiotika-Konzentration innerhalb des Agar-LB-Mediums eingesetzt. Zusätzlich wurden 0,2% (w/v) Glucose zugesetzt. Im Falle weiterer Plasmid-Transformationen wurde analog verfahren. Platten mit zwei und mehr Antibiotika wurden bei 30–37 °C bis zur sichtbaren Koloniebildung (16–48 h) inkubiert.

II.3.7 Restriktionsverdau zur Plasmid-Kontrolle

Zur Analyse gereinigter Plasmide wurden diese mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die resultierenden Fragmente mittels DNS-Chipelektrophorese (Abschnitt II.3.9) analysiert. Üblicherweise in dieser Arbeit eingesetzte Enzyme waren *NlaIII*, *Hinfi*, *HindIII* & *HaeIII*. Ansätze (20 µL) enthielten 5 µL gereinigtes Plasmid (II.3.1) (50–500 ng·µL⁻¹), 2 µL des enzymespezifischen 10x Puffers sowie 0,5 µL des jeweiligen Restriktionsenzym und wurden bei 37 °C für 1–1,5 h inkubiert.

II.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Präparierte genomische DNS und Proben, deren Analyse mittels MultiNA-Chipelektrophorese (II.3.9) nicht möglich war, wurden mittels Agarose-GE gemäß [305] analysiert. Es kam TAE-Puffer und Gele mit 0,8–1,2% (w/v) Agarose zum Einsatz. DNS-Proben wurden mit 6x TriTrack DNS Ladepuffer (Fermentas) gemischt und in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei konstant 120 V für 50 min. Anschließend wurde das Gel für 20 min in EtBr-Lösung ($0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) geschwenkt, zweifach mit VE-Wasser gewaschen und mittels Geldokumentationskammer GelDoc 2000 (Bio-Rad) unter UV-Licht Bestrahlung (302 nm) fotografiert.

II.3.9 MultiNA-Chipelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Produkten (II.3.3) und mittels Restriktionsverdau (II.3.7) geschnittener Plasmide kam die Chipelektrophorese (MCE-202 MultiNA[®], Shimadzu) zum Einsatz. Aufgrund der deutlich besseren Sensitivität und Auflösung im Vergleich zur Agarose-GE (II.3.8) sowie digitaler Datenausgabe und Hochdurchsatz-Kapazität war diese Technologie ein zwingend notwendiger Begleiter aller Klonierungsarbeiten in dieser Arbeit.

Die analytische Sektion des Geräts bestand aus vier parallelen Chips und einer automatischen Pipettiereinheit. Verschiedene Ampholyt-Puffer (DNA-500: bis 600 bp; DNA-1000: bis 1600 bp; DNA-2500: bis 3500 bp) wurden abhängig von dem zu erwartenden Fragmentierungsmuster eingesetzt. Als DNS-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff wurde den Puffern SYBR[®] Gold (Invitrogen) zugesetzt. 20 μL Probe wurden gemäß Herstellerangaben analysiert.

II.3.10 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung von geeigneten pF-Insert-Konstrukten erfolgte extern durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Es wurden 50–100 ng gereinigte Plasmid-DNS und in allen Fällen die Sequenzierungsprimer SQ-360 bzw. SQ-361 (Tabelle VI.1) eingesetzt.

II.4 Proteinchemische Methoden

II.4.1 Zellaufschluss und Herstellung zellfreier Extrakte

Die Art des Zellaufschlusses erfolgte abhängig von der Stabilität des Zielproteins oder -komplexes sowie Art und Menge der Zellen. Üblicherweise wurden 2–4 mL Puffer pro g

Zellfeuchtmasse eingesetzt und die Zellen vollständig resuspendiert. Der Aufschlussgrad wurde mikroskopisch beurteilt.

Cn wurde stets mittels Ultraschall auf Eis (60% Power; Zyklus 50% für 10 min gesamt) unter zirkulärer Kühlung in 15 bzw. 50 mL Rosettengefäßen aufgeschlossen. Im Falle von *Ec* kamen zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz: Für die Reinigung von akzessorischen (Hyp) Proteinen oder Komplexen kam Ultraschall wie für *Cn* beschrieben zum Einsatz. Für Hydrogenase-Reinigungen oder diesbezügliche Zelltests wurden die resuspendierten Zellen durch 3–6 Zyklen Gefrieren (-80 °C; 30 min) / Auftauen (25 °C; 15 min) aufgeschlossen.

Die Extrakte wurden anschließend per Zentrifugation bei 2 °C für 45–60 min geklärt. Falls nicht anders angegeben, wurden auf diese Weise S12 (12.000 g), S20 (20.000 g) oder S140 (140.000 g) Extrakte hergestellt.

II.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Proteinbestimmung nach Bradford [306] wurde das Roti[®]-Nanoquant System (Roth) benutzt und im 1 mL Halbmikro-Küvettenformat gemäß Herstellerangaben verfahren. Eine Kalibriergerade im linearen Bereich wurde mit BSA als Standard aufgenommen.

II.4.3 Proteinreinigung

Proteinreinigungen wurden bei RT oder 4 °C vorgenommen. Dabei wurde säulenchromatographisch unter Einsatz von FPLC-Pumpensystemen, Peristaltikpumpen (jeweils Pharmacia), Gravitationsfluss oder Zentrifugation (Spin Columns) gereinigt.

II.4.3.1 Reinigung von Hyp-Komplexen

Hox- und Hyp-Proteine sowie Hyp-Komplexe wurden mittels Affinitätschromatographie (Strep-Tactin Matrices) gereinigt. Dabei wurden je nach Stabilität und Strep-Tag-Verfügbarkeit Pufferbasis AP1 oder AP2 eingesetzt und die Waschvolumina variiert. Für SpinColumn-Reinigungen wurden ca. 1 g Zellen in 1 mL Puffer resuspendiert, mittels Gefrieren/Auftauen aufgeschlossen und die Zielkomponenten per Herstellerangaben gereinigt. Das Elutionsvolumen lag hierbei üblicherweise bei 100 µL Puffer AES. Alternativ wurde mit 1 mL StrepTactin[®] Superflow Gravity Flow, 5 mL StrepTactin[®] Superflow-HPR oder 5 mL StrepTactin[®] MacroPrep-HPR Säulen gereinigt. Reinigungen erfolgten nach Herstellerangaben mit Modifikation des Puffers und der Waschvolumina. Zur Elution wurden Puffer AE1 oder AE2, und zur Säulenregeneration Puffer AR eingesetzt. Elutionsfraktionen à

0,5 mL (1 mL Säule) bzw. 1,5 mL (5 mL Säule) wurden aufgenommen, anschließend gemäß II.4.3.4 konzentriert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Alle Reinigungen erfolgten bei Raumtemperatur.

II.4.3.2 SH_{rek}-Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinanten SH-Varianten erfolgte bei 4 °C mittels 5 mL StrepTactin[®] Superflow Gravity Flow Säulen. Üblicherweise wurden 5–10 g Zellen aus 500–1000 mL Autoinduktionskulturen in Puffer AH resuspendiert und mittels Gefrieren/Auftauen aufgeschlossen. Nach der Extraktklärung (II.4.1) wurde der S140 Extrakt auf die zuvor äquilibrierte Säule geladen, gefolgt von 2–5 Säulenvolumen (SV) Puffer AP1 zur Entfernung ungebundener Proteine. Anschließend wurde das Enzym mit Puffer AE1 eluiert, wobei Fraktionen à 1,5 mL aufgenommen wurden. Fraktionen mit SH-Aktivität wurden gepoolt und gemäß II.4.3.4 aufkonzentriert. Die Säule wurde mit 15 SV Puffer AR regeneriert.

Die konzentrierte Probe wurde anschließend auf eine mit Puffer AP1 äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/300 geladen. Fraktionen mit SH-Aktivität (Volumen je Fraktion 0,5 mL) wurden gepoolt und konzentriert (II.4.3.4). Gereinigte SH wurde aliquotiert, mit 5% (v/v) Glycerin versetzt und bei 4 °C, -20 °C oder -80 °C gelagert.

II.4.3.3 SH_{wt}-Reinigung aus *Cupriavidus necator*

Für die Reinigung der endogenen SH aus *Cn* wurde ein zuvor optimiertes Protokoll [203] modifiziert. 10 g Zellen aus optimierten Wachstumsversuchen (Abschnitt III.2.1) wurden in 40 mL Puffer AH resuspendiert und per Ultraschall aufgeschlossen (II.4.1). Nach Herstellung des S20-Extrakts wurde fein gemörstertes Ammoniumsulfat langsam unter Rühren auf Eis zugegeben (35% Sättigungskonzentration). Die resultierende Suspension wurde für weitere 30 min auf Eis gerührt und das Präzipitat anschließend bei 10.000 g und 2 °C für 30 min abgetrennt. Der Überstand wurde unter Rühren auf Eis mit festem K₃[Fe(CN)₆] (10 mM Endkonzentration) versetzt und mit reinem Sauerstoff durchflutet. Anschließend wurde Ammoniumsulfat (60% Sättigung) wie zuvor beschrieben zugegeben. Nach erneuter dreißigminütiger Stabilisierungszeit wurde das Präzipitat bei 10.000 g und 2 °C für 30 min abzentrifugiert. Das SH-enthaltende 60%-Pellet wurde in 40 mL eiskaltem Puffer DEAE-A gelöst und für drei Stunden auf Eis gegen 5 L Puffer DEAE-A dialysiert (MWCO = 6–8 kDa). Im Anschluss an die Dialyse wurde die Proteinlösung auf eine zuvor mit Puffer DEAE-A äquilibrierte DEAE-Sepharose Fast Flow Säule (40 mL Bettvolumen) mittels 50 mL-

Superloop geladen. Die Elution erfolgte durch lineare Erhöhung der Salzkonzentration (Gradient 0–500 mM KCl; → 0–33,3% Puffer DEAE-B) in Fraktionen à 10 mL. Die SH eluierte im KCl-Konzentrationsbereich zwischen 120–180 mM. Stärker an die Säule gebundene Proteine wurden mittels Hochsalzpuffer (100% DEAE-B) entfernt. Fraktionen mit SH-Aktivität wurden gepoolt und auf ein Volumen von 50–100 µL eingengt (II.3.3.4).

Die konzentrierte Probe wurde anschließend auf eine mit Puffer DEAE-A äquilibrierte Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR 10/300 geladen. Fraktionen mit SH-Aktivität (Volumen je Fraktion 0,5 mL) wurden gepoolt und konzentriert (II.4.3.4). Gereinigte SH wurde aliquotiert, mit 5% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

II.4.3.4 Konzentrierung gereinigter Proteine

Proteinaufkonzentrierungen im Anschluss an Reinigungen erfolgten üblicherweise mit VivaSpin 6 oder 20 (Sartorius) Membrankonzentratoren (MWCO 3 / 10 / 30 / 50 / 100 kDa) mit den vom Hersteller empfohlenen maximalen g-Zahlen im Festwinkelrotor bei 2 °C.

II.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese & Western Blot

II.4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen, Reinheitsprüfung von gereinigten Proteinfractionen sowie Größenbestimmung einzelner Proteine wurde die SDS-PAGE eingesetzt [307]. Zellfreie Proben wurden hierzu nach entsprechender Verdünnung 1:1 mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und nach Abkühlung auf RT in die Taschen eines zuvor präparierten Gels (Tabellen II.4 und II.5) geladen.

Zelllysate für die SDS-PAGE wurden präpariert, indem das jeweilige Zellpellet in 1x SDS-Ladepuffer resuspendiert sowie für 15 min bei 95 °C aufgeschlossen und denaturiert wurde. Zelltrümmer wurden für 30 min bei 16.000 g abzentrifugiert. 5 µL (~25 µg) des Überstands wurden in die Taschen eines zuvor präparierten Gels geladen. Resuspendierungsvolumina wurden hierbei so gewählt, dass eine finale Proteinkonzentration von 5 mg·mL⁻¹ resultierte [Richtwert: 175 (µg Protein)·(mg Zellen)⁻¹]. Zur Größenorientierung wurden geeignete Proteinstandards (BR Unstained Protein Ladder oder BR Prestained Protein Ladder, Fermentas) eingesetzt. Die SDS-PAGE wurde bei konstant 200 V für 60–65 min betrieben.

Tabelle II.4 – Pipettierschema für die Herstellung eines SDS-PAGE Laufgels.

Komponente	Endkonzentration	Acrylamid-Konzentration					Einheit
		8	10	12	15	18	%
VE-Wasser	-	2.370	2.070	1.770	1.320	870	µL
1 M Tris/HCl pH 8,8	375 mM	2.250					µL
40% Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1	variabel	1.200	1.500	1.800	2.250	2.700	µL
SDS (10% (w/v))	0,10%	60					µL
TEMED (10% (v/v))	0,05%	30					µL
APS (10% (w/v))	0,15%	90					µL
Endvolumen		6.000					µL

Tabelle II.5 – Pipettierschema für die Herstellung eines SDS-PAGE Kammgels.

Komponente	Endkonzentration	Acrylamid-Konzentration		Einheit
		8	10	%
VE-Wasser	-	850	750	µL
0,95 M Tris/HCl pH 6,8	375 mM	790		µL
40% Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1	variabel	300	400	µL
SDS (10% (w/v))	0,10%	20		µL
TEMED (10% (v/v))	0,05%	10		µL
APS (10% (w/v))	0,15%	30		µL
Endvolumen		2.000		µL

II.4.4.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (N-PAGE)

Zur Visualisierung nativer Proteinkomplexe wurde die N-PAGE mit entweder einheitlicher oder gradueller Acrylamid-Konzentration eingesetzt. Enzymproben wurden hierzu auf die gewünschte Konzentration eingestellt, mit 5x N-PAGE-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Präparation von Gradienten-Nativgelen (Tabelle II.6) erfolgte mit dem in Abb. II.1 dargestellten Aufbau.

Tabelle II.6 – Pipettierschema für die Herstellung von N-PAGE Lauf- und Kammgelen.

Komponente	Endkonzentration	Acrylamid-Konzentration					Einheit
		3	4	10	15	16	%
VE-Wasser	-	1.590	1.515	1.065	690	615	µL
1 M Tris/HCl pH 8,8	375 mM	1.125					µL
40 % Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1	variabel	225	300	750	1.125	1.200	µL
TEMED (10 % v/v)	0,05%	15					µL
APS (10% (w/v))	0,15%	30					µL
Endvolumen		2.000					µL

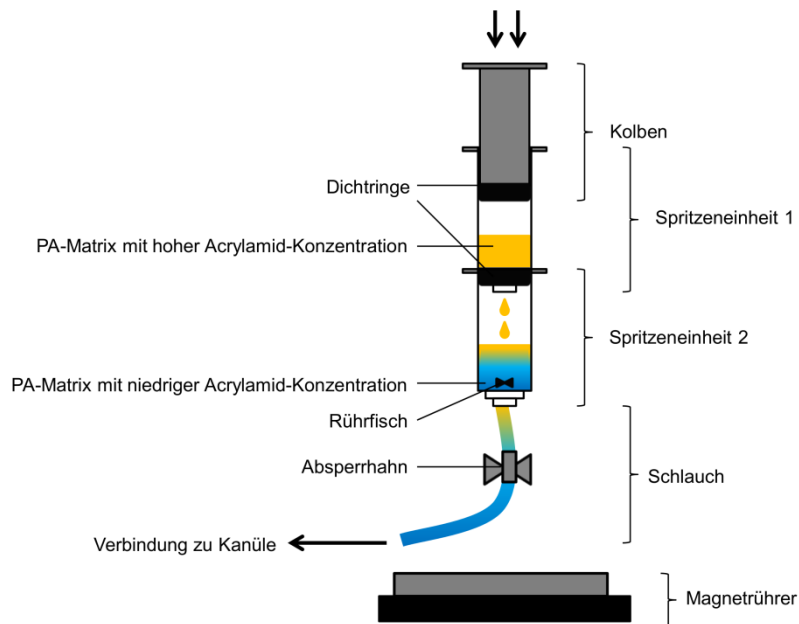


Abb. II.1 – Gießstation für die Präparation von Gradienten-Nativgelen. Die untere Spritzeneinheit wurde zunächst mit 2,5 mL der Gelmatrix niedriger Konzentration (z. B. 3% AA) gefüllt. Der Absperrhahn des Schlauchs wurde hierzu geschlossen. Durch einen Rührfisch innerhalb der unteren Spritzeneinheit wurde die Durchmischung während der folgenden Schritte gesichert. Mit der oberen Spritzeneinheit wurden anschließend 2,5 mL der Matrix höherer Konzentration (z. B. 15% AA) aufgezogen. Die obere Einheit wurde daraufhin mittels eines abgeschliffenen Dichtrings passend auf die untere Einheit aufgesetzt und der Absperrhahn des Schlauchs geöffnet. Über den Kolben der oberen Einheit wurde folglich der Druck und damit die Tropfrate und Fließgeschwindigkeit gesteuert. Der Ausgang der Verbindung wurde durch eine lange Kanüle am Schlauchende gebildet. Diese wurde am Boden des zu gießenden Gels platziert, um durch Unterschichtung die Bildung eines stabilen Gradienten zu gewährleisten.

Der Laufpuffer wurde vor dem Start des Laufs auf Eis gekühlt. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei konstant 15 mA pro Gel für 1,5–2 h (Gel einheitlicher Konzentration) oder 2–2,5 Stunden (Gradienten-Gel).

II.4.4.3 2D-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinproben in zwei Dimensionen wurde nach einem adaptierten Protokoll [308] durchgeführt. Die native Trennung des Proteingemisches unter Erhaltung der gefalteten Komplexe erfolgte mittels Gradienten-N-PAGE (II.4.4.2), gefolgt von der denaturierenden Trennung der Komplexe mittels SDS-PAGE (2. Dimension; II.4.4.1). Für die SDS-PAGE kamen modifizierte Kammgele zum Einsatz, welche anstatt der üblichen 10-, bzw. 15-Taschenkämme eine einzelne, längliche Tasche sowie eine kleinere Tasche für einen Proteinstandard aufwiesen. Die jeweiligen Gelstreifen der N-PAGE wurden im Anschluss an den Lauf der 1. Dimension ausgeschnitten, für 30 min in 1x SDS-Ladepuffer getaucht und für

den SDS-PAGE Lauf in die längliche Tasche eingelegt. Die Laufbedingungen sowohl der N-, als auch SDS-PAGE waren analog den in II.4.4.1 und II.4.4.2 aufgeführten Parametern.

II.4.4.4 Coomassie-Färbung von PA-Gelen

Die standardisierte Prozedur zum Färben von PAA-Gelen erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva) [309]. Gele wurden mit VE-Wasser gewaschen und für 30 min in zuvor erhitzter (Mikrowelle, 380 W, 3 min) Färbelösung geschwenkt. Der nicht proteingebundene Farbstoff wurde anschließend durch jeweils 30minütiges Schwenken in erhitztem (siehe oben) Entfärber 1 bzw. normal temperiertem (RT) Entfärber 2 entfernt. Der Schritt in Entfärber 2 wurde verlängert, bis der Hintergrund wasserklar erschien.

II.4.4.5 Silber-Färbung von PA-Gelen

Die proteinspezifische Silberfärbung wurde gemäß [310,311] vorgenommen. Aufgrund der Sensitivität der Methode wurden Proben und Standards im Vergleich zur Coomassie-Färbemethode 1:5–1:10 verdünnt aufgetragen.

II.4.4.6 Western Blot

II.4.4.6.1 Transfer und Konjugat-Bindung

Zur selektiven Visualisierung mittels SDS-PAGE (II.4.4.1) oder Nativ-PAGE (II.4.4.2) aufgetrennter StrepII-getaggter Proteine kam der Western Blot zum Einsatz [312]. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte im ‚Tank-Blot Verfahren‘ unter Kühlung auf Eis (konstant 0,5 A für 2 Stunden; Puffer: Western-Blot Transferpuffer). Im Anschluss wurde die Membran für 1–3 Stunden in Blockierungspuffer inkubiert, gefolgt von drei Waschschritten mit PBS-T (je 5 min). Daraufhin erfolgte die einstündige Inkubation der Membran mit dem StrepTactin-HRP (*horseradish peroxidase*) Konjugat. Hierbei wurde das Konjugat in einer 1:4.000 (chromogene Detektion) bzw. 1:100.000 Verdünnung (Chemilumineszenz) in PBS-T eingesetzt, gefolgt von je zwei Waschschritten mit PBS-T sowie PBS (je 1 min pro Schritt). Alle Post-Transfer-Schritte erfolgten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.

II.4.4.6.2 Detektion

Die chromogene Detektion erfolgte gemäß Herstellerangaben (Strep-Tag HRP chromogenic detection kit). Eine sensitivere Detektion wurde bei Bedarf durch ein Chemilumineszenz-Verfahren erreicht (*enhanced chemiluminescence*; ECL) [313]. Hierbei wurde die Membran zunächst für 2 min mit der ECL-Lösung inkubiert und anschließend innerhalb einer Röntgenfilm-Kassette mit einer Klarsichthülle fixiert. Dort erfolgte die Abbildung auf Röntgenfilm (Fuji X-Ray RX, 100 NIF), welcher innerhalb einer Dunkelkammer mittels eines Kodak GBX-Entwickler und –Fixierer Systems entwickelt wurde.

II.4.5 SH-Aktivitätsmessung

II.4.5.1 H₂ : NAD⁺-Aktivität

Die physiologische SH H₂:NAD⁺ Aktivität wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm (Absorptionsmaximum NADH, $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) über die Zeit bestimmt. Hierbei wurde innerhalb eines Anaerobzelts (Formiergas-Atmosphäre 2,5–5% H₂, Rest N₂) gemessen und der Assaypuffer für 3 h–ü. N. mit der Gasphase äquilibriert.

Test des Enzyms in Anwesenheit verschiedener O₂-Konzentration erfolgte durch variable Zugabe eines Luft-, bzw. Reinst-O₂-gesättigten Assaypuffers. In diesen Fällen (aerobe Messungen) wurde zur H₂-Zugabe ein mit 80% H₂ (Rest N₂) gesättigter Assaypuffer eingesetzt, wobei die finale H₂-Konzentration so gewählt wurde, dass sie dem üblichen Konzentrationsbereich (19–38 μM unter Formiergas-Atmosphäre) entsprach. Testansätze (bei anaeroben Messungen: 1 mL in Halbmikro-Küvetten; bei aeroben Messungen: 1 mL in einer mit Silikonstopfen verschlossenen Quarz-Küvette) enthielten üblicherweise 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (variable Konzentration an gelösten Gasen, siehe oben), 10–20 μL Probe, 1 μM FMN und 5 μM NADH zur Aktivierung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM NAD⁺ gestartet.

II.4.5.2 H₂ : Benzylviologen-Aktivität

Die Diaphorase-, und FMN-a unabhängige [246] Reduktion von Benzylviologen (BV) wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 600 nm (Absorptionsmaximum BV, $\epsilon_{600} = 7,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) über die Zeit bestimmt. Die Reaktionsbedingungen und Assay-Zusammensetzungen waren analog II.4.6.1 mit dem Unterschied, dass statt NAD⁺ Benzylviologen (Endkonzentration 2,5 mM) zugegeben wurde.

II.4.5.3 NADH : Ferricyanid Diaphorase-Aktivität

Der Test des Diaphorase-Moduls erfolgte mittels photometrischer Bestimmung der NADH:K₃Fe(CN)₆ Aktivität. Als Detektionsbasis diente entweder die Oxidation von NADH (Extinktionsabnahme bei 340 nm; $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) oder die Reduktion von Ferricyanid (Extinktionsabnahme bei 420 nm; $\epsilon_{420} = 1,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Die Messung erfolgte aerob oder anaerob nach Signalstabilisierung, wobei jeweils Kontrollen mitgeführt wurden. Testansätze (1 mL in Halbmikro-Küvetten) enthielten üblicherweise 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM K₃Fe(CN)₆ sowie 1,25 mM NADH. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL Enzymprobe gestartet.

II.4.6 Zellfreie Prozessierungstechniken

II.4.6.1 Vorbereitung und Herstellung der Extrakte

Sämtliche Expressionsstämme für die Herstellung der ZFM-Extrakte (ZFM = Zellfreie Maturation) wurden durch Transformation von *E. coli* BL21Star™ (II.3.6.1) mit pEntry-Konstrukten generiert (siehe auch Tabelle III.13). Transformanten wurden ohne vorherige Vereinzelung in Reagenzröhrchen (4 pro Stamm mit je 3 mL LB-Medium inkl. 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kanamycin) ü. N. bei 30 °C und 550 UpM geschüttelt. Tags darauf wurde der Inhalt der 4 Röhrchen jedes Stamms vereinigt und zur Inokulation der Induktionskultur eingesetzt [500 mL Schikanekolben mit 100 mL HEM-Medium + 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kanamycin; 0,05% (w/v) Glucose; 1% (v/v) Glycerin; 0,3% (w/v) Laktose; 100 μM Fe(III)-NH₄-Citrat; 25 μM NiCl₂]. Die Autoinduktion erfolgte gemäß II.2.1.2.2 bei 180 UpM für 36 h. Die Zellen wurden anschließend per Zentrifugation geerntet und für jeden Stamm zusammengeführt. Je nach Vorhaben (einheitlicher Aufschluss mit einem Puffer oder alternativ Test verschiedener Puffer für die ZFM) wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Der Zellaufschluss erfolgte mit 5 Zyklen Gefrieren/Auftauen (II.4.1) unter Einsatz von 2 mL des jeweiligen Puffers (siehe II.4.6.2; Puffer ohne Avidin; + 0,1 mM PMSF) pro Gramm Zellfeuchtmasse. Anschließend wurden die S20-Extrakte hergestellt (II.4.1), diese in Volumina à 300 bzw. 500 μL aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren (kein Aktivitätsverlust innerhalb 6 Monaten). Extrakte wurden lediglich einmal aufgetaut.

II.4.6.2 Zellfreie Maturation mit Extrakten

Benötigte Extrakte (sowie bei Bedarf gereinigte Proteine und Komplexe) wurden auf Eis aufgetaut. Als Basispuffer für ZFM-Assays wurde üblicherweise 50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 5

mM MgCl₂ eingesetzt. In Testexperimenten wurden darüber hinaus 50 mM MOPS/KOH pH 7,0 bzw. 50 mM KPi pH 7,0, jeweils inkl. 5 mM MgCl₂, getestet. Die für den Assay eingesetzte Pufferbasis determinierte den Aufschlusspuffer (II.4.6.1), d. h. es wurden nur Komponenten mit gleicher Pufferbasis kombiniert. Assays (Gesamtvolumen 100 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäßen) wurden für 10–90 min (Standard: 35 min) bei variablen Temperaturen (Standard: 30 °C für M1-; 37 °C für M2-Assays) gefahren. Die Komponenten sind in Tabelle II.7 zusammengefasst. Anaerobe Assays wurden innerhalb eines Anaerobzelts (Atmosphäre: Formiergas 2,5 – 5% H₂ / Rest N₂) inkubiert. In diesem Falle wurde der Basispuffer zuvor ü. N. mit der Zelt-Atmosphäre äquilibriert. Zum Stopp der Reaktion wurden die Ansätze in einem Eisbad platziert. Die Messung der SH H₂:NAD⁺ Aktivität erfolgte gemäß II.4.5.1.

Tabelle II.7 – Zusammensetzung der ZFM-Assays.

Komponente	Konzentrationsbereich	Standard-Endkonzentration/-Anteil	Basislösung/Extrakt
Extrakt mit SH-Untereinheiten	15–60% (v/v)	15% (v/v)	15–30 ^b mg·mL ⁻¹
Extrakte mit M1/M1 Proteinen ^a	je 7,5–60% (v/v)	7,5% (v/v) Einzel; 15% (v/v) Voll	15–30 ^b mg·mL ⁻¹
Dithiothreitol (DTT)	1–5 mM	2,5 mM	250 mM
ATP	1–5 mM	2,5 mM	50 mM
GTP	0,5–2 mM	-	50 mM
FeSO ₄	10–100 µM	50 µM	5 mM
NiCl ₂	10–500 µM	20 µM	2 mM
FMN	1–50 µM	10 µM	1 mM
Carbamoylphosphat (CMP)	25–250 µM	50 µM	5 mM
Puffer	ad 100 µL		
Endvolumen	100 µL		

^a Die Anzahl der eingesetzten Extrakte pro Assay war variabel. M1- und M2-Extrakte, in denen alle Gene eines Reifungssatzes koexprimiert wurden (pE.M1 oder pE.M2 Plasmide), wurden in Endkonzentrationen von 15% (v/v) zugegeben („Voll“). Im Falle von Extrakten mit binären Konstrukten (z. B. HypC1D1-Extrakt + HypA2B2-Extrakt, usw.) wurden die einzelnen Extrakte jeweils in Konzentrationen von 7,5% (v/v) oder 15% (v/v) zugegeben („Einzel“). In Assays mit gereinigten Proteinen oder Komplexen wurden diese mit der Pufferbasis verdünnt und in geeigneten Volumina zu den Ansätzen zugegeben.

^b Die Proteinkonzentration aller Extrakte wurde üblicherweise auf 20 mg·mL⁻¹ eingestellt.

II.4.7 Analytische Methoden

II.4.7.1 Kolorimetrische Eisenbestimmung mit Feren

Die Bestimmung von nicht-Häm-Eisen in gereinigten Proteinen erfolgte nach einem beschriebenen Protokoll [314] mittels des Fe(II)-Chelators 3-(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazin-5',5''-disulfonat (Feren). Der blau gefärbte Fe(II)-Feren-Komplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 593 nm und kann photometrisch quantifiziert werden.

100 µL Probe (im Falle der SH mit idealerweise 0,5–1 µM Protein) wurden mit 100 µL 1% (w/v) HCl versetzt und bei 80 °C für 15–20 min erhitzt, resultierend in der Mobilisierung der Eisen-Ionen. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt und durch Zugabe von 500 µL 7,5% (w/v) Ammoniumacetat neutralisiert. Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 100 µL 2,5% (w/v) SDS denaturiert. Die Reduktion der Fe(III)-Ionen zu Fe(II) erfolgte durch frisch hergestellte Ascorbinsäure-Lösung (100 µL; 4% (w/v)). Im Anschluss wurde der Chelator Feren (100 µL; 1,5% (w/v)) zugegeben und das Gemisch für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die Messung des Überstands erfolgte bei 593 nm in Halbmikro-Küvetten. Zur Kalibrierung wurde Mohr's Salz $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ verwendet und eine Standardgerade im Bereich 0–20 µM Fe(II) aufgenommen.

II.4.7.2 UV/Vis Spektroskopie

Zur vollständigen Reduktion von Proteinen für die Aufnahme von Differenzspektren kam Natriumdithionit zum Einsatz. Letzteres wurde von Sigma-Aldrich in 85%iger Reinheit bezogen. Durch Messung der Absorption einer anoxischen Lösung mit bekannter Einwaage bei 315 nm ($\epsilon_{315} = 8,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) konnte eine tatsächliche Reinheit von 79% bestimmt werden. Um die Qualität des O₂-empfindlichen Dithionits zu verbessern, wurde die Chemikalie unter strikt anaeroben Bedingungen zweifach rekristallisiert. Die Prozedur erfolgte im Anaerobzelt mit sauerstofffreien Lösemitteln nach einem modifizierten Protokoll von McKenna [315]. 30 g Natriumdithionit wurden in 200 mL einer 0,1 M NaOH-Lösung gelöst. Anschließend wurden 440 mL eines 0,1 M NaOH/Methanol (20:80) Gemischs langsam und kontinuierlich zugegeben. Der sich bildende weiße Niederschlag wurde über einen Glasfilter (F-Porosität) abgetrennt, getrocknet und der Prozedur ein weiteres Mal unterzogen. Die Reinheit lag bei 93% (1. Kristallisation) bzw. 96% (2. Kristallisation).

UV/Vis Spektren im Bereich 200–700 nm wurden mit einem NanoDrop ND-1000 Photometer (Thermo Fisher Scientific) (2 µL Probenvolumen) und für Differenzspektren mit einem Ultrospec 2100pro (GE Healthcare) Spektrophotometer (1 mL Quarzküvette) aufgenommen.

Zur Aufnahme von Differenzspektren wurde oxidierte SH (1 mg·mL⁻¹) zunächst analysiert (250–700 nm), anschließend mit Natriumdithionit (0,1–1 mM finale Konzentration) unter anaeroben Bedingungen für 1,5 h reduziert („Bleichen“) und erneut im selben Wellenlängen-Bereich analysiert. Bei Bedarf wurde die Probe anschließend erneut mit Luftsauerstoff reoxidiert.

III ERGEBNISSE

III.1 Klonierung der *Cupriavidus necator* Gene

III.1.1 Auswahl und Klonierung der individuellen *Cn* Gene

Das *Cupriavidus necator* Genom enthält drei separate Cluster mit putativen Hydrogenase-assoziierten Struktur- und reifungsrelevanten Genen ([234,236], Abschnitt I.3.2; Abb. III.1).

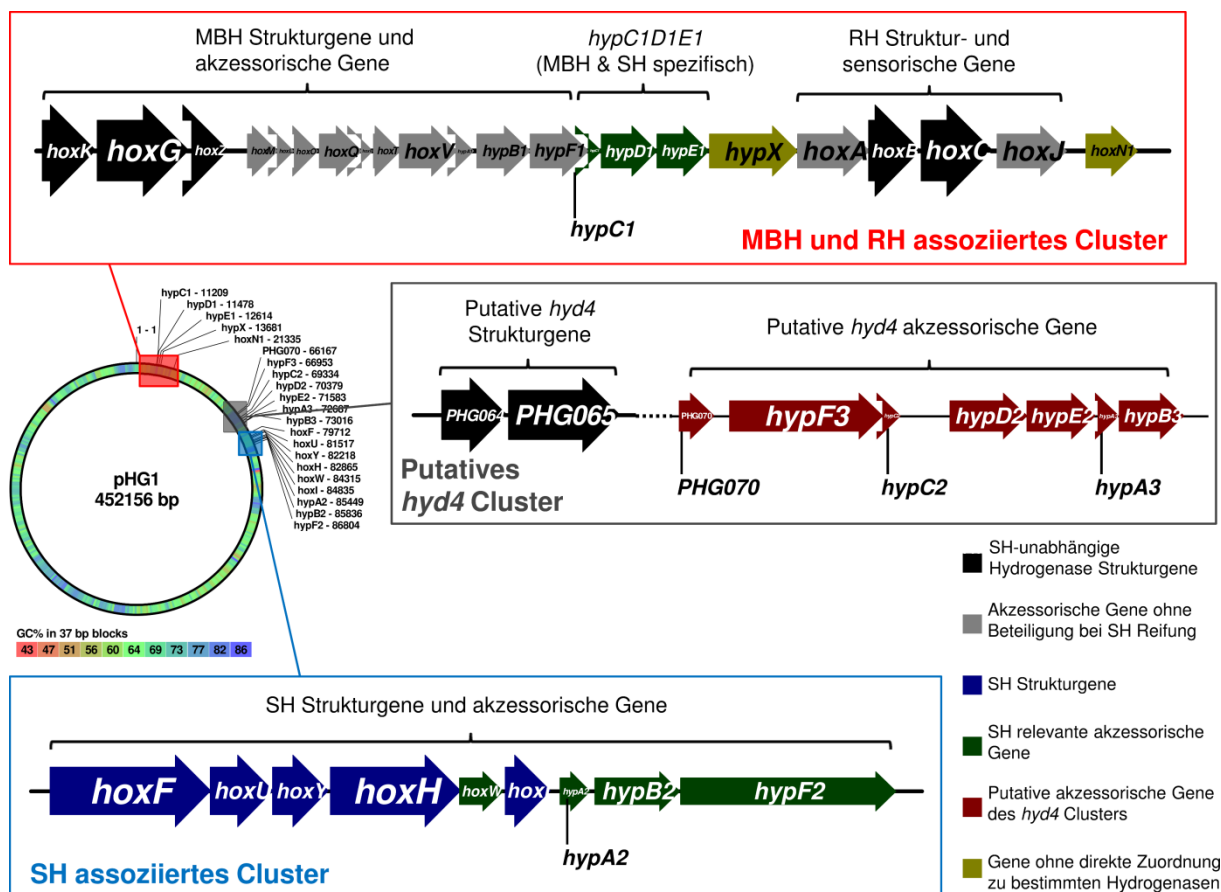


Abb. III.1 – Verteilung der Hydrogenase-assoziierten Gene auf dem Megaplasmid pHG1 aus *Cn*. Erklärung: siehe Text. Physikalische Loci: MBH-, und RH-Cluster: 100–22390; *hyd4* Cluster: 59962–74032; SH Cluster: 79712–89227). Die in dieser Arbeit klonierten und assemblierten Gene sind in den jeweiligen Farben (siehe Legende) dargestellt. Die nicht zur Klonierung eingesetzten Gene sind in grau bzw. schwarz dargestellt. Strukturgene sind durch breitere Pfeile gekennzeichnet.

Zwischen MBH- und SH-assoziierten Hilfsproteinen (Reifungsfaktoren) existieren teilweise funktionale Überschneidungen. So enthält das MBH- und RH-Cluster beispielsweise einen vollständigen Satz an *hyp*-Genen, von denen zumindest *hypC1*, *hypD1*, *hypE1* und *hypX* auch zur Reifung der SH benötigt werden [162,163,316]. Das SH-Cluster ist benachbart von einem partiellen Satz duplizierter *hyp*-Gene (*hypA2*, *hypB2* und *hypF2*), welche die analogen Gene

auf dem MBH-Cluster komplementierten können [316]. Ein weiteres Gen innerhalb des SH-Clusters, *hoxW*, ist essentiell für die Reifung der SH. Es kodiert eine Endopeptidase HoxW, welche die C-terminale Verkürzung von HoxH im Anschluss an die Assemblierung des [NiFe]-Zentrums katalysiert (Abb. I.2) [196,198]. In Kombination bildeten diese acht Gene folglich die essentielle Basis zur funktionalen Produktion rekombinanter SH. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird diese Gen-Kombination (*hoxW*, *hypA2B2C1D1E1F2X*) als Reifungssatz M1 bezeichnet (Tabelle III.1).

Tabelle III.1 – Liste der in dieser Arbeit klonierten Gene, deren Fragmentierung und eingefügte Mutationen.

Locus Index	Gen	Amplifizierte Fragmente	Eingefügte stille Mutationen	Fragment- und ORF-Längen ^a
SH Strukturgene				
PHG088	<i>hoxF</i>	2	-	912 + 903 // 1.809 bp
PHG089	<i>hoxU</i>	2	I: G ₃₀₆ → A	307 + 404 // 705 bp
PHG090	<i>hoxY</i>	2	II: C ₂₆₁ → A	262 + 374 // 630 bp
PHG091	<i>hoxH</i>	1	-	1.467 bp
PHG093	<i>hoxI</i>	1	III: G ₄₈₆ → T; G ₄₈₉ → T; G ₄₉₂ → A; G ₄₉₈ → A	504 bp
Hyp Maturationssatz M1 (SH assoziiert)				
PHG092	<i>hoxW</i>	1	-	498 bp
PHG094	<i>hypA2</i>	2	II: G ₂₃₄ → A	234 + 114 // 342 bp
PHG095	<i>hypB2</i>	2	II: C ₃₃₆ → A	336 + 633 // 963 bp
PHG015	<i>hypC1</i>	1	-	273 bp
PHG016	<i>hypD1</i>	1	-	1.140 bp
PHG017	<i>hypE1</i>	1	-	1.056 bp
PHG096	<i>hypF2</i>	3	II: G ₆₅₁ → A; C _{1.353} → A // III: G _{2.409} → A; G _{2.412} → A; G _{2.415} → A; C _{2.418} → A; C _{2.421} → T	651 + 705 + 1.077 // 2.424 bp
Hyp Maturationssatz M2 (<i>hyd4</i> assoziiert)				
PHG070	-	1	-	552 bp
PHG077	<i>hypA3</i>	1	-	330 bp
PHG078	<i>hypB3</i>	1	-	1.017 bp
PHG073	<i>hypC2</i>	1	III: G ₂₇₃ → A; G ₂₇₆ → A; C ₂₇₉ → A; G ₂₈₂ → A	288 bp
PHG075	<i>hypD2</i>	1	-	1.212 bp
PHG076	<i>hypE2</i>	2	II: C ₅₅₂ → T	554 + 520 // 1.068 bp
PHG072	<i>hypF3</i>	3	III: G ₁ → A; C ₆ → A; C ₉ → A; G ₁₅ → A; G ₁₈ → A; G ₂₁ → A; C ₂₄ → A; G ₂₇ → A	807 + 823 + 770 // 2.391 bp
Cluster-unabhängige Gene				
PHG018	<i>hypX</i>	3	II: C ₂₇₉ → T	279 + 797 + 727 // 1.794 bp
PHG023	<i>hoxN1</i>	2	II: G ₈₇₃ → A	873 + 189 // 1.056 bp

I. Stille Mutation zur Eliminierung einer internen *LguI*-Schnittstelle (GCTCTTC); **II.** Stille Mutation zur Eliminierung einer internen *Esp3I*-Schnittstelle (CGTCTC); **III.** Stille Mutation zur Absenkung des GC-Gehalts.

^a Länge Fragment 1 [bp] + Länge Fragment 2 [bp] (+ Länge Fragment 3 [bp]) // **Länge ORF.**

Als Ergebnis der Sequenzierung des pHG1 Megaplasמידs im Jahre 2003 [236] konnte ein weiteres Hydrogenase-Cluster, welches einen vollständigen Satz putativer Reifungsgene enthält (*hyd4*, Abb. III.1), annotiert werden. Zu Beginn dieser Arbeit war die Rolle des *hyd4* Clusters unklar, da keines der dort kodierten Genprodukte jemals nachgewiesen werden konnte [206]. Darüber hinaus stand die Demonstration einer weiteren Aufnahme-Hydrogenase aus, da *Cn* in Abwesenheit der MBH- und SH-Gene seine Fähigkeit zum Wachstum auf H₂ verliert [134]. Um einen ersten Nachweis der Funktionalität des in *hyd4* kodierten Reifungsapparats vorzunehmen und die Fähigkeit zur Komplementation der M1 Hyp Proteine zu untersuchen, wurden *hypC2*, *hypD2*, *hypE2*, *hypF3*, *hypA3* und *hypB3* in die Klonierungsstrategie mit einbezogen und bildeten zusammen mit *hoxW* und *hypX* den M2 Reifungssatz (Tabelle III.1). Da HoxW als essentiell für die Reifung der SH vorausgesetzt werden konnte, war die putative C-terminale *hyd4* Protease, welche von PHG070 kodiert wird, lediglich Teil der Substitutions- und nicht der regulären Expressionsversuche. Ein weiteres Gen, *hoxN1*, wurde den Sätzen M1 und M2 im späteren Verlauf der Arbeit hinzugefügt. Es kodiert eine membrangebundene hochaffine Nickel-Permease [238,240,241,317,318].

Die in dieser Arbeit eingesetzte Klonierungstechnologie basiert auf der Weiterentwicklung eines Systems, welches zuvor in unseren Laboren entwickelt wurde [304] und kommerziell als StarGate[®] System (IBA) erhältlich ist. Tabelle II.2 liefert eine Übersicht über die eingesetzten Originalvektoren, während Tabelle VI.2 zusätzlich die im Zuge dieser Arbeit neu designten Vektoren enthält. Amplifikation der 21 zur Klonierung ausgewählten *Cn* Gene mittels PCR erfolgte entweder über die jeweils vollständige Gensequenz (vollständiger ORF) oder fragmentiert. Die Fragmentierung wurde abhängig von der Sequenzlänge vorgenommen, um anschließende Sequenzierungen ohne interne Primerpaare zu gewährleisten. Darüber hinaus wurden stille Mutationen via Primerdesign eingefügt, um interne klonierungsrelevante *LguI*-, oder *Esp3I*-Restriktionsschnittstellen zu entfernen und/oder um zusätzlich den Schmelzpunkt GC-reicher Start- oder Endsequenzen zu senken (Tabelle III.1).

Daraus resultierte eine Gesamtanzahl von 34 PCR-generierten Amplifikaten. Diese wurden nach Bestätigung der korrekten Größen (MultiNA-Chipelektrophorese; Abb. III.2 und Tabelle III.2) *Blunt End* in ein lineares pF-Vektorrückgrat [pF (linear)] eingefügt. pF (linear) wurde hierbei via PCR mit dem Fusionsvektor pFF.rbs3a als Matrize amplifiziert (Primerliste Tabelle VI.1). Infolge der *Blunt*-Ligation wurde ein Gemisch von Konstrukten mit dem jeweiligen Fragment in der „normalen“ oder inversen Orientierung erzeugt. Anhand der resultierenden Restriktionsschnittstellen konnte die jeweilige Orientierung ermittelt werden

(Abb. III.4). pF-Konstrukte wurden sequenziert und im Falle 100%iger Übereinstimmung mit der gewünschten Sequenz zum Transfer in pENTRY (blue) eingesetzt. Innerhalb dieses Schritts wurden Genfragmente zu den vollständigen Gensequenzen (ORFs) kombiniert. Bei nicht fragmentierten Genen (vollständige ORFs) wurde analog verfahren. Da zwar die Restriktionsschnittstellen (*LguI*) durch den Vektor, die gewünschten Überhänge jedoch durch die endständigen Sequenzen der Fragmente bestimmt wurden, war die Orientierung des Gens bzw. Genfragments für den pEntry-Transfer irrelevant (Abb. III.3). Ausgehend von den 21 pE-Konstrukten wurden alle weiteren Subklonierungsschritte vorgenommen. Abb. III.4 stellt alle initialen Schritte zur Generierung der Entry-Konstrukte dar.

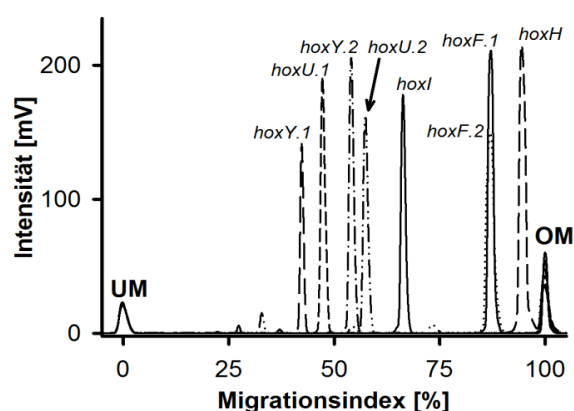


Abb. III.2 – MultiNA-Analyse der PCR-generierten Fragmente am Beispiel der SH-Strukturgen-Fragmente. Für Fragmentgrößen siehe Tabelle III.2. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker.

Tabelle III.2 – MultiNA-Analyse von PCR-Amplifikaten am Beispiel der SH-Strukturgen-Fragmente. Die mittels MultiNA Software bestimmten Sequenzlängen wurden mithilfe geeigneter DNS-Standards berechnet.

Fragment	Erwartete Sequenzlänge	MultiNA Sequenzlänge
<i>hoxF.1</i>	912 bp	955 bp
<i>hoxF.2</i>	903 bp	950 bp
<i>hoxU.1</i>	307 bp	303 bp
<i>hoxU.2</i>	404 bp	405 bp
<i>hoxY.1</i>	262 bp	266 bp
<i>hoxY.2</i>	374 bp	374 bp
<i>hoxH</i>	1.467 bp	1.536 bp
<i>hoxI</i>	504 bp	481 bp

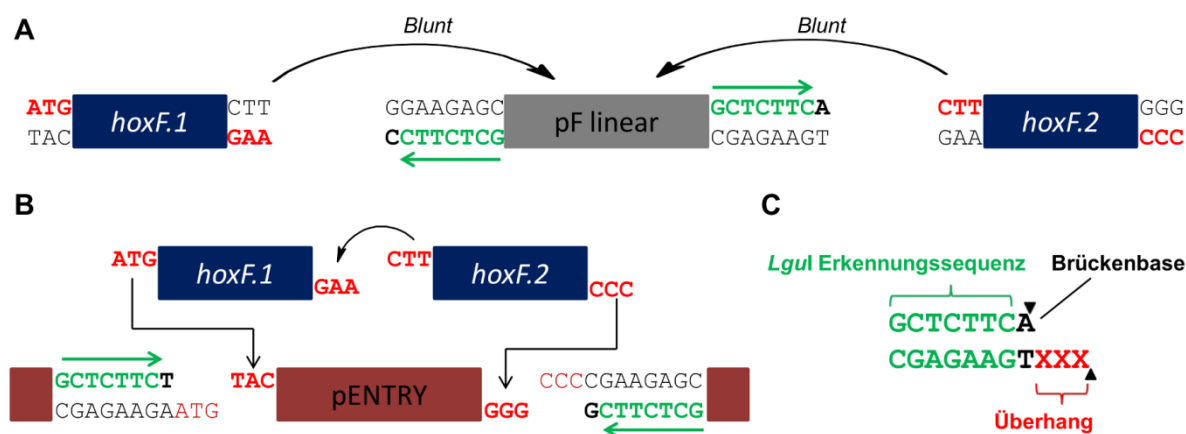
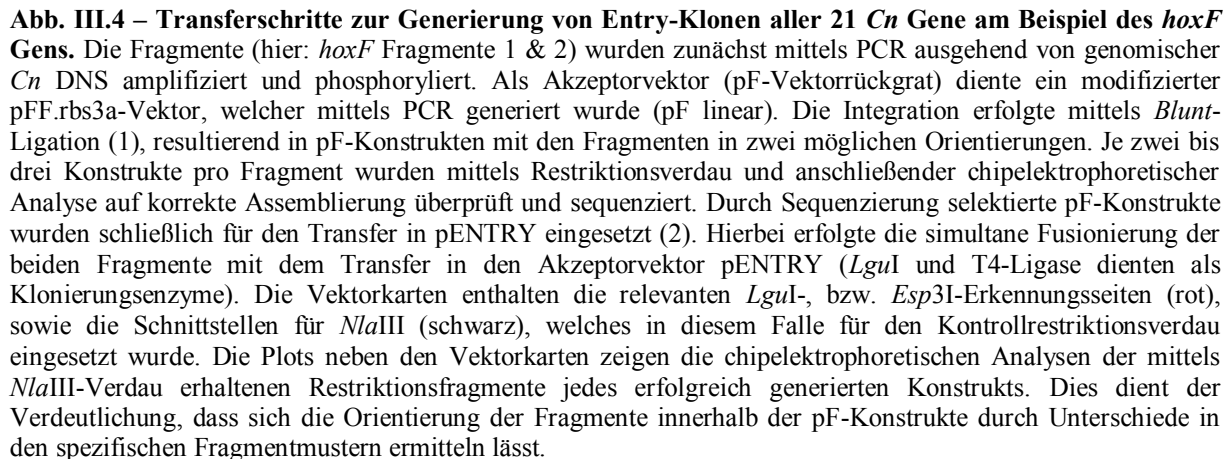


Abb. III.3 – *LguI*-generierte Überhänge zur Fusionierung von Genfragmenten am Beispiel des *hoxF* Gens. Durch *Blunt*-Ligation wurden die beiden Fragmente separat in einen linearen pF-Vektor integriert. Hierbei wurden die für die Fusionierung relevanten *LguI*-Überhänge bereits durch die Fragmente selber gestellt, während die *LguI*-Erkennungssequenzen (ohne Überhang) am 5'- und 3'-Ende des Akzeptorvektors vorlagen (A). Folglich war die Orientierung des Fragments innerhalb des pF-Konstrukts für den anschließenden Transfer (Fusion & Integration in pENTRY) irrelevant, da durch *LguI*-Verdau (B) in jedem Falle die korrekten Überhänge erzeugt wurden. Die Struktur der vollständigen *LguI*-Rekombinationsequenz ist in (C) dargestellt. Die beiden in dieser Arbeit eingesetzten Klonierungsenzyme *LguI* und *Esp31* sind Typ II-Restriktionsendonukleasen, welche außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden [304].



Um die Produktion aller 21 Zielproteine (Tabelle III.3) in *Escherichia coli* separat testen zu können, wurden diese zunächst in die StarGate®-Expressionsvektoren pASG-wt (Expression unter Kontrolle des Tetracyclin-Regulons), sowie pPSG-wt (P_{T7}-kontrollierte Expression) subkloniert. *E. coli* BL21Star™ (DE3) oder *E. coli* Rosetta™ pLys-E (DE3) kamen hierbei als Expressionsstämme zum Einsatz.

Tabelle III.3 – Liste der in dieser Arbeit produzierten rekombinanten Cn Proteine. Die Einteilung entspricht der in Tabelle III.1 eingeführten Kategorisierung (SH-, M1-, M2-, unabhängige Proteine).

Mögliche Funktion/Rolle des Genprodukts	SH Strukturproteine		M1 Reifungsfaktoren		M2 Reifungsfaktoren		Unabhängige Hilfsproteine	
	Protein	MM	Protein	MM	Protein	MM	Protein	MM
Diaphorase große Untereinheit (GU)	HoxF	67 kDa						
Diaphorase kleine Untereinheit (KU)	HoxU	26 kDa						
H ₂ ase kleine Untereinheit (KU)	HoxY	23 kDa						
H ₂ ase große Untereinheit (GU)	HoxH	55 kDa						
Diaphorase-ass. NADPH-Aktivierungsseite	HoxI	19 kDa						
Nickel-Speicherung und -Insertion mit HypB			HypA2	12 kDa	HypA3	12 kDa		
Nickel-Speicherung und -Insertion; GTPase			HypB2	35 kDa	HypB3	36 kDa		
H ₂ ase GU-Chaperon, Transfer der Fe-Gruppe			HypC1	10 kDa	HypC2	10 kDa		
Transfer der Fe-Gruppe mit HypC; redoxaktiv			HypD1	42 kDa	HypD2	44 kDa		
CN ⁻ -Transfer auf Fe-HypC-HypD; ATPase			HypE1	37 kDa	HypE2	37 kDa		
CN ⁻ -Synthese aus CMP und HypE-Modifikation			HypF2	86 kDa	HypF3	85 kDa		
C-terminale Verkürzung der H ₂ ase GU			HoxW	19 kDa	PHG070	19 kDa		
Funktion: ?; Essentiell für H ₂ ase O ₂ -Toleranz							HypX	66 kDa
Hochaffine Nickel-Permease							HoxN1	39 kDa

Abkürzungen: MM = Molekulare Masse; CMP = Carbamoylphosphat

Die Produktion aller rekombinanten Genprodukte mit Ausnahme von HoxN1 konnte erfolgreich mittels IPTG- sowie Autoinduktion (pPSG Konstrukte) oder Induktion mit AHT (pASG Konstrukte) demonstriert werden (Abb. III.5). Die Produktion des Membranproteins HoxN1 konnte unter den getesteten Bedingungen nicht in dem Maße bewerkstelligt werden, dass eine SDS-PAGE-Visualisierung des Expressionserfolgs möglich gewesen wäre (Abb. III.5). Da es in diesem Falle bei Induktionsstart zu komplettem Stillstand des Zellwachstums kam, kann eine zelltoxische Wirkung der HoxN1-Überproduktion hierbei nicht ausgeschlossen werden. Die Produktion von HoxN1 konnte jedoch durch Einsatz von Basal- bzw. Autoinduktionstechniken erreicht werden. Erfolgreiche Produktion von HoxN1 konnte im späteren Verlauf der Arbeit funktional durch eine signifikante Erhöhung der Reifungseffizienz sowie einem toxischen Effekt erhöhter Nickel-Konzentrationen im Medium demonstriert werden (Abschnitt III.2.2; Abb. III.12).

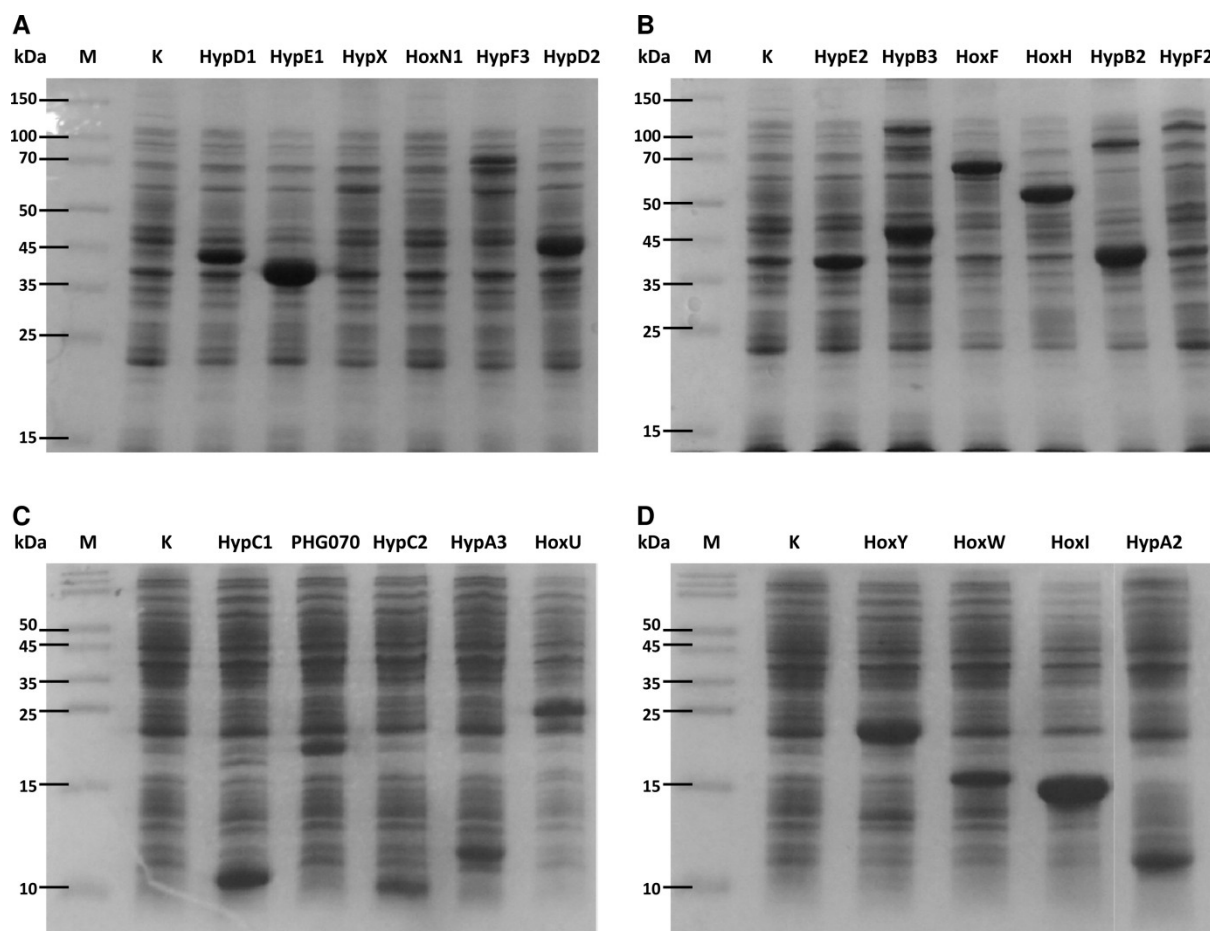


Abb. III.5 – SDS-PAGE Analyse zum Test der Einzeldexpression aller 21 heterologen *Cn* Gene. Alle Expressionsplasmide wurden in *E. coli* BL21Star™ (DE3) funktional getestet. Pro Laufspur wurden 25 µg Gesamtprotein bzw. 5 µL Marker aufgetragen. In (A) und (B) wurden 12%, in (C), (D) 18% PA-SDS-Gele verwendet. M = Marker; K = Kontrolle (*E. coli* BL21Star™ ohne Plasmid). Mit Ausnahme des Kontrollstamms enthielten alle Stämme pPSG-wt Konstrukte mit dem jeweiligen Zielgen unter Kontrolle des T7-Promotors. Im Falle von HoxN1 ist keine sichtbare Überexpression/Produktion erkennbar. Bei HypB2 und HypB3 (B) sind neben den deutlich erkennbaren Banden in der Größenordnung des monomeren Proteins weitere Banden erkennbar, welche auf multimere SDS-resistente Formen der Proteine schließen lassen. Die anhand der AS-Sequenz kalkulierten molekularen Massen der einzelnen Proteine sind Tabelle III.3 zu entnehmen.

III.1.2 Design und Assemblierung der Multigen-Konstrukte

III.1.2.1 Klassische Fusionsstrategie – Assemblierung der *Cn* Gene zu polycistronischen Operons

Moderne kommerziell erhältliche Klonierungssysteme, welche die Fusionierung mehrerer Gene erlauben, verfolgen die Strategie der schrittweisen Verknüpfung von Zielgenen zu artifiziellen Polycistrons. Diese werden anschließend durch Subklonierung in geeignete Akzeptor-/Expressionsvektoren unter Kontrolle eines einzelnen gemeinsamen Promotors gestellt. Innerhalb des StarGate® (IBA) Systems erfolgt dies paarweise unter Einsatz eines *Upstream*- (pNFUSE; hier: pFF.rbs3a) und einen *Downstream*-Fusionsvektor (pCFUSE; hier:

pFF.c). Der Vektor pENTRY dient als Akzeptorvektor des resultierenden Bicistrons und gleichzeitig als Ausgangsvektor für den nächsten Fusionsschritt. Die Fusionsvektoren sind hierbei so designt, dass das zweite Gen mit einer eigenen ribosomalen Bindestelle (*ribosomal binding site*; RBS) versehen wird, welche gleichzeitig als verknüpfende Sequenz der ORFs fungiert.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die klassische Fusionsstrategie zunächst auf die Assemblierung der SH-Strukturgene *hoxFUYHI* angewandt. Nach Transfer verschiedener binärer Genkombinationen in Expressionsvektoren und Test der Expression beider Gene zeigte sich hierbei, dass lediglich bestimmte Genreihenfolgen eine Produktion jeweils beider Genprodukte eines Bicistrons erlaubten. Etwa die Hälfte aller Kombinationen erlaubte nur die Translation des ersten Gens, während das zweite Genprodukt nicht detektiert werden konnte. Aus diesem Grunde wurde eine Screening-Strategie erarbeitet, um eine Reihenfolge für die durchgehende Translation aller fünf Strukturgene zu ermitteln. Hierzu wurden fünf Klonierungsansätze vorbereitet, welche jeweils ein bestimmtes *Upstream*-Konstrukt (z. B. pFF.rbs3a-*hoxF*), die vier übrigen Gene als *Downstream*-Konstrukt (in diesem Falle: pFF.c-*hoxU*, pFF.c-*hoxY*, pFF.c-*hoxH* und pFF.c-*hoxI*) sowie pENTRY als Akzeptorvektor enthielten (II.3.5.2). Die fünf polyklonalen pENTRY-Gemische wurden anschließend ohne Vereinzelungsschritt zur Subklonierung in pASG-wt eingesetzt. Die resultierenden pASG-Konstrukte wurden in *E. coli* BL21Star™ (DE3) transformiert, gefolgt von einer Vereinzelung der Transformanten auf Platte. Je 25 dieser Klone pro Platte/Ansatz wurden im Kleinmaßstab angezogen und die Genexpression via Induktion mit AHT angeregt. Durch Visualisierung der Ganzzell-Lysate mittels SDS-PAGE konnten anschließend funktionale binäre Konstrukte ermittelt und durchgehende Reihenfolgen für alle fünf Gene festgelegt werden. Dabei ergaben sich für die SH-Strukturgene lediglich zwei Möglichkeiten: *hoxYHUF* oder *hoxYFHU* für die tetramere und *hoxIYHUF* oder *hoxIYFHU* für die hexamere SH-Variante (Tabelle III.4). Die Expression der resultierenden polycistronischen SH-Module ermöglichte eine erfolgreiche Produktion aller SH-Untereinheiten (Abb. III.6).

Die polycistronische Assemblierung der akzessorischen Gene förderte anschließend dieselbe Problematik zu Tage. Nachdem über 80% aller binären Kombinationen der M1- bzw. M2-Gene den zuvor beschriebenen Translationsabbruch zeigten, wurde eine Screening-Strategie in diesem Falle verworfen. Um dennoch die systematische Assemblierung der geplanten SH-, M1- und M2-Module zu gewährleisten, wurde eine alternative Fusionsstrategie erarbeitet. Dies hatte die Synthese der pFxt7-Fusionsvektoren zur Folge (Abschnitt III.1.2.2).

Tabelle III.4 – Ergebnisübersicht des Bicistron-Screenings für die SH Strukturgene.

		Gen 2 (pFF.c-X)				
		<i>hoxF</i>	<i>hoxU</i>	<i>hoxY</i>	<i>hoxH</i>	<i>hoxI</i>
Gen 1 (pFF.rbs3a-X)	<i>hoxF</i>		-	-	+	-
	<i>hoxU</i>	+		-	+	-
	<i>hoxY</i>	+	-		+	-
	<i>hoxH</i>	-	+	-		-
	<i>hoxI</i>	+	+	+	+	

Die signifikante Produktion zweier Genprodukte ausgehend von einem Vektor (als Bicistron) wurde als erfolgreich betrachtet (+). Im Falle eines nicht detektierbaren zweiten Genprodukts wurde die Reihenfolge als nicht erfolgreich bewertet (-).

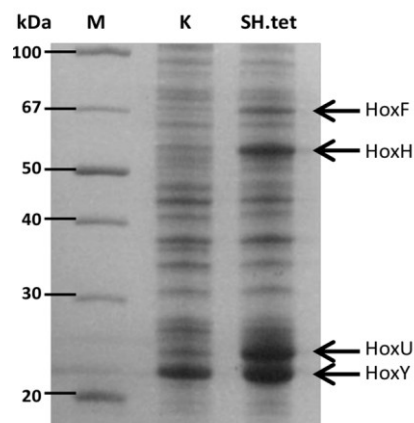


Abb. III.6 – SDS-PAGE Analyse zum Test der Expression des *hoxFUYH*-Polycistrons. Pro Laufspur wurden 25 µg Gesamtprotein bzw. 5 µL Marker aufgetragen (Gel: 12% PAA). M = Marker; K = Kontrolle (*E. coli* BL21Star™ ohne Plasmid); SH.tet = *E. coli* BL21Star™ (DE3) + pASG-wt-*hoxYHUF*. Das synthetische polycistronische Operon stand unter Kontrolle des Tet-Regulons. Die Induktion erfolgte mit AHT.

III.1.2.2 Innovative Fusionsstrategie – Assemblierung P_{T7}-kontrollierter Genkassetten

Wie anhand der in Abschnitt III.1.2.1 demonstrierten Problematik ersichtlich ist, konnte das ursprüngliche Klonierungsvorhaben aufgrund verschiedener Limitierungen nicht mit dem bestehenden StarGate® Basis-System umgesetzt werden. Aufgrund dessen wurden mehrere Erweiterungen in das System implementiert, um den geänderten Anforderungen, welche in folgenden Punkten zusammengefasst werden, Rechnung zu tragen: i) Das Expressionssystem sollte die einheitliche Produktion aller Plasmid-kodierten Genprodukte unabhängig von der Anordnung oder Anzahl der Gene gewährleisten; ii) Der regulierende Promotor sollte möglichst variabel hinsichtlich Induktions-/Expressionsstrategien sein, einschließlich Induktionsstärke und -länge; iii) Jedes rekombinante Genprodukt, unabhängig von seiner Position innerhalb des assemblierten Moduls, sollte bei Bedarf mit N- oder C-terminalen Affinitäts-Tags (z. B. StrepII) fusioniert werden können; iv) Limitierungen hinsichtlich der Anzahl koexprimierter Gene sollten beseitigt werden; v) Um eine erleichterte Kombination eigenständiger Module (z. B. SH, M1, M2) zu ermöglichen und kombinatorische Reifungsstudien (Essentialität/Substituierbarkeit von Genprodukten) durchführen zu können, sollte das System außerdem mehrere kompatible Vektoren zur Koexpression bereitstellen.

Die Punkte i) bis iii) wurden durch die Synthese der Fusionsvektoren pFnT7(wt), pFnT7(3'), pFnT7(5') sowie pFcT7(wt), pFcT7(3') und pFcT7(5') erfolgreich abgedeckt (Abb. VI.43). Wie die bisherigen Fusionsvektoren pFF.rbs3a und pFF.c enthalten die pFxT7-Vektoren

Rekombinationsstellen (*Esp3I*-in) für die Aufnahme von Genen aus pEntry-Konstrukten. Im Gegensatz zur schrittweisen Assemblierung der Gene (zu einem polycistronischen Operon) erlaubt das neue Fusionssystem jedoch die Assemblierung von Genkassetten (d. h. individuellen Transkriptionseinheiten mit jeweils eigenem Promotor und Terminator). Aufgrund der in Abschnitt III.2.2 erläuterten Möglichkeiten und Charakteristika des dadurch resultierenden Expressionssystems wurde der T7-Promotor (lacUV5/T7 System) ausgewählt. Die Generierung individueller Transkriptionseinheiten bietet den zusätzlichen Vorteil, dass der Expressionsnachweis assemblierter Gene bereits innerhalb jedes intermediären Konstrukts vollzogen werden kann. Dadurch wird die zeitnahe Kontrolle jedes Assemblierungsschritts sowohl auf Nukleinsäure- als auch Expressionsebene gewährleistet (Abb. III.7).

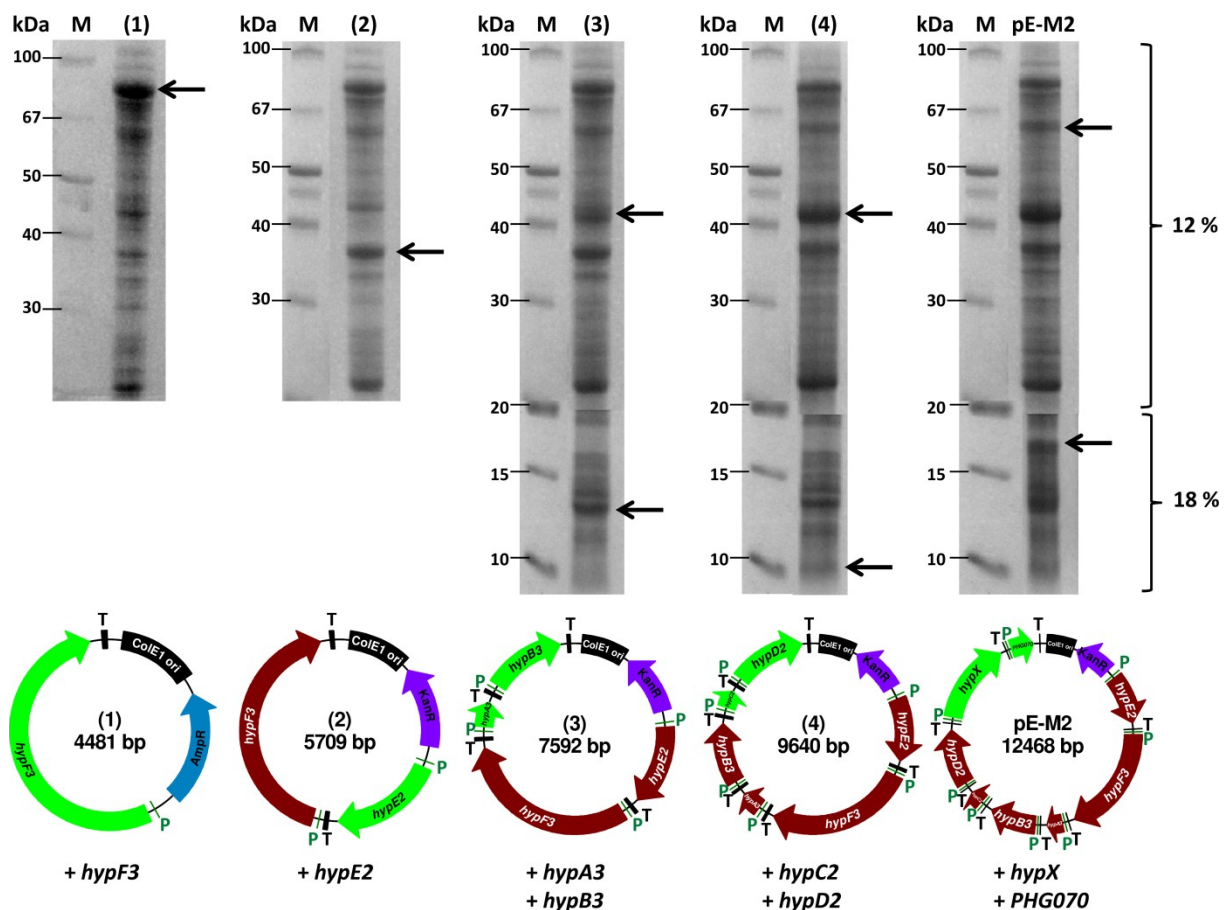


Abb. III.7 – Schrittweiser Test der M2-Assemblierung mithilfe des entwickelten pFxT7-Fusionssystems. Der obere Teil der Abbildung stellt die Expressionsanalyse der unten gezeigten Vektorkonstrukte mithilfe von *E. coli* BL21Star™ (DE3) nach Induktion mit IPTG dar. 25 µg der jeweiligen Zelllysate bzw. 5 µL Marker wurden mittels Coomassie-gefärbten 12% (und wo angegeben 18%) PAA-SDS-Gelen visualisiert. Die dargestellte Abbildung zeigt teilweise zusammengesetzte Gelbilder (12% & 18%-PA-Gele), um den gesamten relevanten Größenbereich aufzulösen. Die seitlichen Pfeile markieren die Bereiche der jeweiligen Genprodukte, deren Gene innerhalb des Assemblierungsschritts hinzugefügt wurden (in den Vektorkarten grün hervorgehoben und unter den Vektorkarten nochmals ausgeschrieben). Die zu erwartenden molekularen Massen der Proteine sind Tabelle III.3 zu entnehmen. Abkürzungen: P = T7 Promotor; T = T7 Terminator; (1)-(4): intermediäre M2-Assemblierungskonstrukte; pE-M2 = pE-Vektor mit vollständig assembliertem M2-Reifungssatz.

Den oben genannten Anforderungen iv) und v) wurde anschließend durch Design zweier kompatibler Plasmide begegnet, welche die vektorkombinatorische Koexpression verschiedener Module (SH-, M1- und M2-Derivate) in einer Zelle erlauben sollten. Mit dem Vektor pEntry (ColE1 ori, Kan^R) in Kombination mit den individuell T7-Promotor-kontrollierten Genen stand hierzu bereits ein geeigneter „Expressionsvektor“ zur Verfügung. Dieser wurde durch die *de novo* synthetisierten Vektoren pSm.CDF.3a (CloDF1/CDF ori, Sm^R) und pAmp.RSF.3a (RSF ori, Amp^R) ergänzt (Abb. VI.44). Das Duet™ (Novagen) System stellte die dafür benötigten Komponenten zur Verfügung. Analog zu den Basis-StarGate®-Expressionsvektoren (pASG / pPSG) wurden die kompatiblen Vektoren mit *Esp3I*-in Rekombinationsstellen zur Aufnahme von Modulen aus pEntry-Konstrukten ausgestattet. Die Kombination von pEntry-Konstrukten (SH-Module) mit pSm.CDF.3a-Konstrukten (M1- oder M2-Module) erwies sich innerhalb dieser Arbeit als optimal sowohl für SH-Produktions- als auch Reifungsexperimente (Abschnitte III.2.2, III.4.2 und III.4.3). Tabelle III.6 verschafft einen Überblick über weitere getestete Vektorkombinationen, während Abb. III.8 die Expressionsanalyse einer Auswahl finaler Module/Konstrukte liefert. Die wichtigsten Konstrukte für die Expression der M1- und M2-Module waren pSm.CDF.3a-Derivate, im weiteren Verlauf der Arbeit als pM1 (*hypA2B2C1D1E1F2X* und *hoxW*) und pM2 (*hypA3B3C2D2E2F3X* und *hoxW*) bezeichnet. Die Konstrukte pM1-*hoxN1* sowie pM2-*hoxN1* erlaubten die zusätzliche Produktion der hochaffinen Nickel-Permease HoxN1. PHG070, welches eine putative Endopeptidase kodiert (*hyd4*), wurde lediglich in Substitutions-experimenten anstelle des *hoxW*-Gens eingesetzt (Abschnitt III.4.3). Für die SH Strukturgene wurden aufgrund der höheren Kopienzahl (ColE1 ori; ca. 40 Zelle⁻¹) verglichen mit pSm.CDF.3a (CDF ori; 20–40 Zelle⁻¹) überwiegend pEntry-Konstrukte eingesetzt (als pSH-Derivate bezeichnet). Das SH-Modul wurde hierbei in verschiedenen Modifikationen assembliert: pSH4.wt (*hoxFUYH*; tetrameres Enzym ohne HoxI), pSH6.wt (*hoxFUYHI*; hexameres Enzym), pSH4.Strep (*hox'FUYH*; tetrameres Enzym mit N-terminal getaggtm HoxF; SH_{Var1}) sowie pSH6.Strep (*hoxFUYH'I*; hexameres Enzym mit N-terminal getaggtm HoxI; SH_{Var2}). Alle Gene standen unter Kontrolle eigener T7-Promotoren und –Terminatoren. Durch *de-novo*-Synthese des pAmp.RSF.3a-Vektors (RSF ori; Amp^R) wurde die Möglichkeit eröffnet, einen zusätzlichen Vektor mit höherer Kopienzahl (>100 Zelle⁻¹ im Vergleich zu ca. 40 Zelle⁻¹ bei ColE1 [319]) einsetzen zu können. Jedoch erwiesen sich pA-Konstrukte als umso instabiler, je mehr Genkassetten integriert wurden. Bei Halbierung der Carbenicillin-Konzentration im Medium konnte die Selektion pA-SH4.wt- und pA-SH4.Strep-beinhaltender Stämme aufrecht erhalten werden (Stämme: NAES; Tabelle III.6). Da Ampicillin und

Carbenicillin gegenüber Kanamycin oder Spectinomycin geringere Stabilitäten in wässriger Lösung aufweisen [320], erwiesen sich die Einsatzmöglichkeiten der pA-Konstrukte im Rahmen der in Abschnitt III.2.2 beschriebenen Kultivierungsstrategien als limitiert.

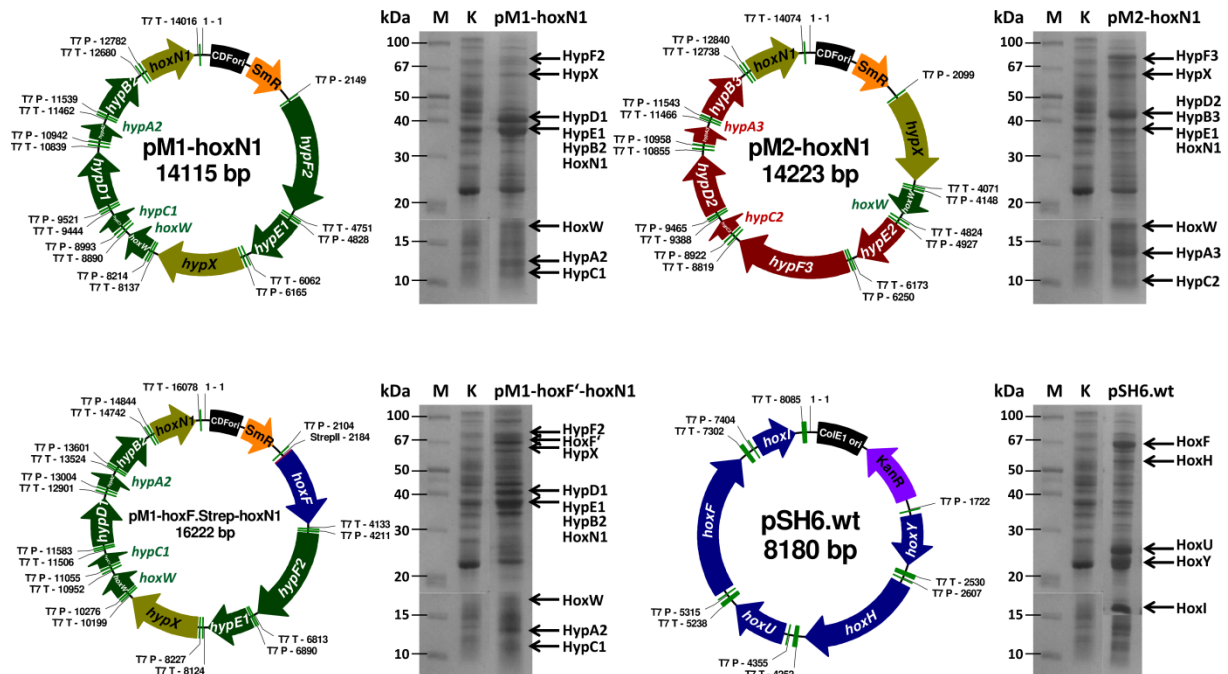


Abb. III.8 – Vektorkarten & Expressionsanalysen einer Auswahl generierter Multigen-Expressionskonstrukte. Vektorkarten: Alle Gene innerhalb der hier gezeigten Module standen unter Kontrolle individueller T7-Promotoren (T7 P) und –Terminatoren (T7 T). SmR = Spectinomycin Resistenzgen; KanR = Kanamycin Resistenzgen; HoxF' = N-StrepII-HoxF; Expressionsanalysen: SDS-PAGE Analyse der Zelllysate von jeweils transformierten *E. coli* BL21Star™ (DE3) nach Induktion mit IPTG. 25 µg der resultierenden Zelllysate bzw. 5 µL Marker wurden mittels Coomassie-gefärbten 12% (und wo angegeben 18%) PA-SDS-Gelen visualisiert. Die dargestellte Abbildung zeigt kombinierte Gelbilder (12% & 18%-PA-Gele), um den gesamten relevanten Größenbereich aufzulösen. Die seitlichen Pfeile markieren die zu erwartenden Bereiche der jeweiligen Genprodukte (Molekulargewichte der Proteine, siehe Tab. III.3). M = Marker; K = Kontrolle (*E. coli* BL21Star™ ohne Plasmid).

Eine alternative Expressionsstrategie wurde durch induktive Entkopplung der Produktion von Struktur- und Hilfsproteinen verfolgt. Durch dieses Vorgehen sollte die *in-vivo*-Reifung der SH in einem bereits mit den rekombinanten *Cn* Hyp-Proteinen gesättigten zellulären Milieu getestet werden. Damit wurde das Ziel verfolgt, einer frühzeitigen Aggregation der präassemblierten Untereinheiten entgegen zu wirken (Abschnitt III.2.2). Zu diesem Zweck kamen Kombinationen aus pASG- (Tetracyclin-Regulon) und pSm.CDF.3a-Derivaten (T7-Kontrolle) zum Einsatz. Für die pASG-Konstrukte wurden die Strukturgene wie in Abschnitt III.1.2.1 beschrieben als Polycistronen assembliert. Die Möglichkeit der Genfusion mit Affinitäts-Tags war hierbei auf das jeweils erste bzw. letzte Gen beschränkt. Das 5'-StrepII-fusionierte *hoxF* Gen wurde aus diesem Grund nicht als Teil des polycistronischen Moduls,

sondern mit dem M1-Reifungsmodul kombiniert und folglich ebenfalls autoinduktiv exprimiert. Eine weitere Variante erlaubte die zusätzliche Kombination des M1-Moduls mit HoxU, um die Produktion des dimeren Diaphorase-Moduls (*hoxFU*) vollständig von der Expression der Hydrogenase-Gene (Gene *hoxYH*) zu entkoppeln. Somit erweiterte sich die Auswahl der Expressionskonstrukte um die in Abschnitt III.1.2.1 aufgeführten polycistronischen Module sowie pASG.wt-*hoxUYH* und pASG.wt-*hoxYH* („SHdec“ Stämme; Tabelle III.6). Die dazu jeweils passenden mit M1 kombinierten Konstrukte waren pM1-*hoxF*.Strep, pM1-*hoxUF*.Strep sowie dieselben Konstrukte inklusive des *hoxNI*-Gens.

III.2 Produktion von Wildtyp- und rekombinanten SH Varianten

Die posttranslationale Reifungsmaschinerie einer [NiFe]-Hydrogenase kann in erster Näherung als mehrstufige Enzymkaskade angesehen werden. Mithilfe molekularbiologischer Werkzeuge kann zwar die effektive Synthese aller Genprodukte, nicht jedoch deren Löslichkeit, Funktionalität und Stabilität vollständig beeinflusst werden. Verschiedene Organismen haben unterschiedliche Mechanismen zur Adaption zellulärer Maschinerien an bestimmte Wachstumsphasen oder Stresssituationen entwickelt. In heterologen Systemen sind elementare zusätzliche Faktoren von Belang, welche in die ohnehin schwierig zu simulierenden Bedingungen mit einbezogen werden müssen. Hierzu gehören beispielsweise Expressions-, und Energiehaushaltsfragestellungen, Aufnahme-Systeme für essentielle Komponenten (hier: Metalltransport) oder die Regulation zentraler Haushaltsgene (z. B. Module für die Assemblierung von FeS-Cluster) in An- bzw. Abwesenheit von O₂. Dies gilt für rekombinante Stoffwechselwege in ähnlicher Weise wie für Reifungswege von komplexen Metalloenzymen. Kultivierungsstrategien stellen daher essentielle empirische Elemente von Multigen-Expressionsversuchen dar.

Um die Wildtyp-Variante der SH aus *Cupriavidus necator* (*Cn*) den rekombinanten Varianten vergleichend gegenüber stellen zu können (Abschnitt III.3), musste diese aus adäquatem Ausgangsmaterial isoliert werden. Eine Reihe von Optimierungsstrategien wurde dementsprechend zunächst für *Cn* bei Wachstum unter heterotrophen Bedingungen entwickelt, um den SH-Gehalt des geernteten Zellmaterials zu maximieren.

III.2.1 Optimierung der SH-Produktion in *Cupriavidus necator*

Wie bereits in Abschnitt I.3.2 beschrieben ist die Produktion der energiekonservierenden Hydrogenasen in *Cn* nicht auf lithotrophe Bedingungen beschränkt. Verschiedene Arbeiten

des letzten Jahrzehnts zeigten vielmehr, dass der Organismus bei Wachstum unter energielimitierten, heterotrophen Bedingungen zu einer deutlich höheren Syntheserate der Enzyme verglichen mit Wachstum auf $\text{H}_2/\text{CO}_2/\text{O}_2$ fähig ist [203,256]. Die Kultivierung erfolgte gemäß den literaturbeschriebenen Arbeiten meist in Batch-Fahrweise. Die höchsten mittels dieser Technik erreichten spezifischen SH-Aktivitäten in zellfreien Extrakten lagen bei $7,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [203] bzw. $11,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [256].

Zu Beginn dieser Arbeit konnten diese literaturbeschriebenen Werte weder bei Kultivierung im 2-Liter-Fermenter, noch im Schüttelkolben erreicht werden. Daraufhin wurden im Zuge einer Reihe von Optimierungsansätzen schrittweise sowohl medienbezogene als auch physikalische Modifikationen der heterotrophen Kultivierung vorgenommen. Durch Erhöhung der Eisen- und Stickstoff-Supplementation wurde hierbei die erste entscheidende Optimierung erreicht ($1,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \rightarrow 6,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; siehe Abb. III.9).

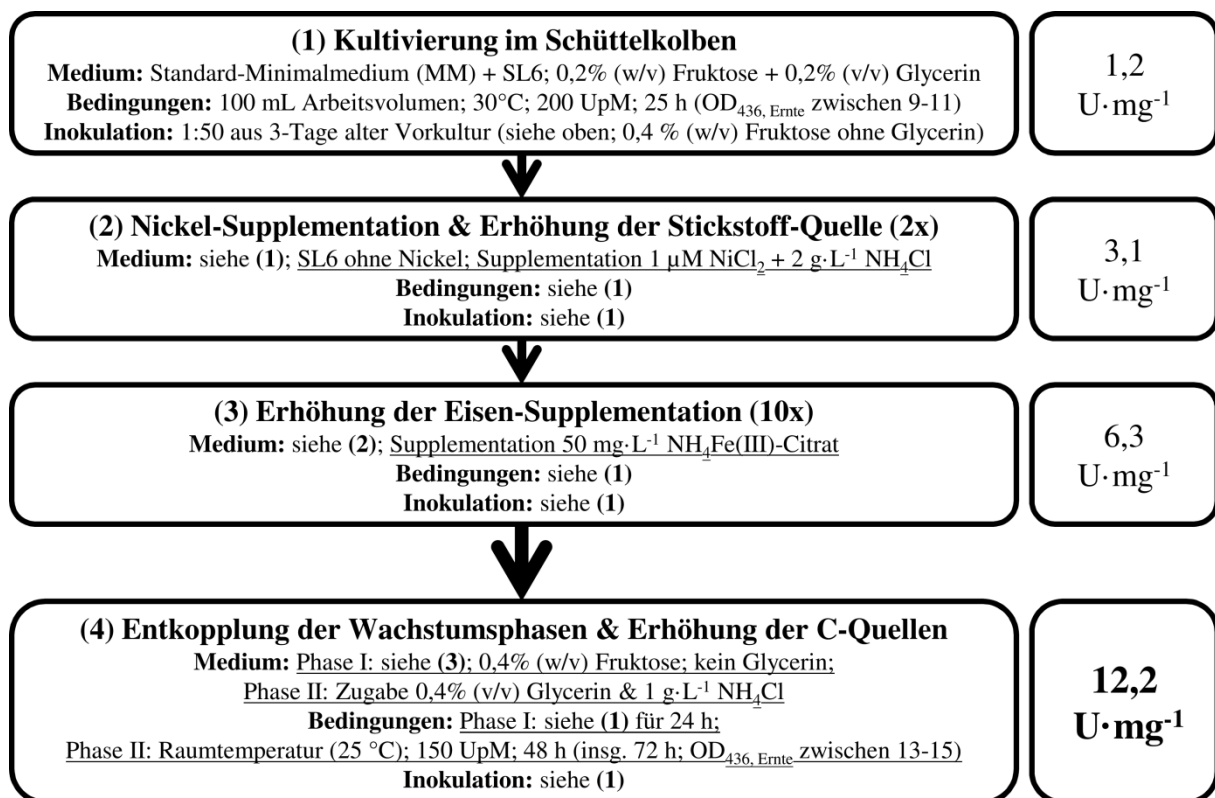


Abb. III.9 – Zentrale Schritte zur Optimierung der SH-Produktion in *Cn* unter heterotrophen Bedingungen. Der initiale Schritt bestand in einer Adaption der in zahlreichen Publikationen der letzten 35 Jahre beschriebenen heterotrophen, „Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen“ [214,219,220], welche hauptsächlich im 10-Liter-Fermenter unter Kontrolle wachstumsrelevanter Parameter erfolgten, auf den Schüttelkolben (1). Anschließend erfolgten sequentielle Modifikationen der Basismedien, Supplemente und physikalischen Bedingungen. Die beiden zentralen erfolgreichen Modifikationen waren hierbei die Erweiterung der Nickel- und Ammoniumchlorid- (2) sowie anschließend der Eisen-Supplementationen (3). Im letzten Schritt wurden schließlich die Biomasse-, sowie die SH-Produktionsphase voneinander getrennt (4). Abschnitt IV.2 liefert eine detaillierte Betrachtung der gezeigten Optimierungsschritte. Abkürzungen: MM = Minimalmedium; SL6 = Spurenelement-Lösung; OD = Optische Dichte.

Die daraufhin vorgenommene Trennung der Wachstumsphasen (Phase I: Wachstum von *Cn* auf Fruktose; optimale Begasung und Temperatur; Phase II: Zugabe Glycerin, Verringerung der Begasung und Temperatur) erhöhte die spezifische SH-Aktivität auf $12,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, was den höchsten bisher für *Cn* dokumentierten Wert darstellt. Die Bedingungen konnten anschließend auf den 1000 mL Schüttelkolben hochskaliert und daher für die Herstellung ausreichender Mengen des hochaktiven Zellmaterials für die folgende SH-Reinigung angewendet werden.

III.2.2 Kultivierungsbedingungen zur Produktion funktionaler SH in rekombinanten *E. coli* Stämmen

Zur Expression heterologer *Cn* Gene unter T7-, oder Tet-Kontrolle wurden die *E. coli* Stämme BL21Star™ (DE3) und Rosetta™ (DE3) pLys-E getestet. Das Plasmid pLys-E (pRARE) enthält unter anderem vier tRNS-Gene, welche in *E. coli* üblicherweise nicht vorkommen. Daher eignet sich der Stamm für die Expression heterologer Gene mit stark von *E. coli* abweichendem Kodongebrauch. Für die *Cn* Gene konnte jedoch keine Problematik hinsichtlich des Kodongebrauchs von *E. coli* festgestellt werden. In beiden getesteten Stämmen wurden vergleichbare Konzentrationen rekombinanter Genprodukte erreicht. Der RNaseE-defiziente *E. coli* Stamm BL21Star™ wurde aufgrund der anfänglich beobachteten Translationsabbrüche gewählt (Abschnitte III.1.2.1 und IV.1).

Alle Expressionsstämme wurden durch sequentielle Transformation von zwei oder drei kompatiblen Expressionsplasmiden erzeugt. Gemäß der in dieser Arbeit vorgenommenen modularen Einteilung der 21 *Cn* Gene (Abschnitt III.1.2.2, Tabellen III.1,3) ist eine im Folgenden beschriebene Gruppierung der generierten Expressionsstämme aus Gründen der Übersicht sinnvoll. Eine Möglichkeit der Einteilung konnte anhand der SH-Variante vorgenommen werden (tetramere oder hexamere SH; Wildtyp, 5'-StrepII-HoxF oder 5'-StrepII-HoxI). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die tetramere SH (HoxFUYH) mit 5'-StrepII-getaggttem HoxF als SH_{Var1}, sowie die hexamere SH (HoxFUYHI₂) mit 5'-StrepII-getaggttem HoxI als SH_{Var2} bezeichnet, um sie von der *Cn*- bzw. rekombinanten Wildtyp-Variante zu unterscheiden (Tabelle III.6). Eine weitere Eingruppierung der Stämme erfolgte anhand der Plasmid-Kombinatorik (Kombination I: pE- mit pSm.CDF.3a-Derivaten; II: pASG- mit pSm.CDF.3a-Derivaten; III: pAmp.RSF.3a- mit pE- und pSm.CDF.3a-Derivaten). Das T7-basierte Expressionssystem bot die Möglichkeit, zwei grundlegend unterschiedliche Induktionstechniken anzuwenden. Die zeitlich festgelegte (üblicherweise 2–5 h) Induktion des lacUV5-Promotors zur Expression des *t7rnep* Gens (T7 RNA Polymerase) durch den künstlichen Induktor IPTG stellt die üblicherweise angewandte Strategie zur Produktion

maximaler Mengen der rekombinanten Proteine pro Zeiteinheit dar. Demgegenüber steht die Wachstumsphasen gesteuerte Induktion mit Laktose im Anschluss an eine Phase der Katabolitrepression („Autoinduktion“ [321]). Letztere Strategie bietet eine deutlich größere Variabilität im Bezug auf Medien- und Wachstumsparameter und erlaubt dadurch ein breites Spektrum an Optimierungen.

Der überwiegende Anteil der rekombinanten *Cn* Proteine konnte im IPTG-basierten Induktionssystem zwar in großen Mengen produziert werden, neigte jedoch stark zur Bildung unlöslicher Aggregate (*inclusion bodies*). Dies konnte weder durch Modifikation des Mediums oder der physikalischen Parameter, noch durch Wechsel auf anaerobe Bedingungen in speziell gepufferten Medien umgangen werden. Sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen konnte in Extrakten von Zellen IPTG-induzierter Expressionsstämme keinerlei SH-Aktivität gemessen werden. Daher wurde im nächsten Schritt die basale Genexpression getestet. Unter Einsatz geeigneter Basismedien konnten bei dieser Strategie alle Genprodukte in ihrer löslichen Form produziert, sowie erstmals SH-Aktivität in Extrakten detektiert werden. Für den Reifungserfolg als essentiell stellten sich hier bereits die Kultivierungsdauer und –temperatur heraus. So konnten maximale Aktivitäten (Stämme K1A, SH1F, SH2F; 0,05–0,2 U·mg⁻¹) nach ca. 35–40 Stunden mit einer bei Raumtemperatur geschüttelten Kultur erreicht werden. Obwohl die Bildung von Aggregaten im Basalexpressions-System nahezu vollständig verhindert wurde, lagen die erzielten SH-Aktivitäten aufgrund des geringen Expressionslevels deutlich unter den im späteren Verlauf der Arbeit erzielten. Basale Genexpression unter anaeroben Bedingungen resultierte in keinerlei Aktivität. Durch Anwendung der T7-Autoinduktions-Technik mit Glucose, Glycerin und Laktose [321] konnten die Aktivitäten der oben genannten Stämme zunächst unter ansonsten identischen Bedingungen auf 0,2–0,6 U·mg⁻¹ erhöht werden. Obwohl die Aktivität der aus anfänglichen Versuchen hergestellten Zellen noch größeren Schwankungen unterworfen war, stellte sich das Autoinduktions-System als ideal hinsichtlich der Optimierungskapazität heraus. Tabelle III.5 und Abb. III.10 stellen alle getesteten Induktionssysteme vergleichend gegenüber.

Bei Berücksichtigung der Plasmid-basierten Einteilung der Stämme (siehe oben) erwies sich Kombination I (pE- mit pSm.CDF.3a-Derivaten) als die hinsichtlich der finalen SH-Aktivität erfolgreichste. Bei dieser Plasmidkombination lag die Gendosis pro Zelle im moderaten Bereich. Diese wird durch den jeweiligen Replikationsursprung (ColE1; ca. 40 Zelle⁻¹ & CDF; ca. 20–40 Zelle⁻¹ [319]) sowie die Genquantität pro Plasmid (pE: 4–5 SH-Gene; pSm.CDF.3a: 8–10 Gene) bestimmt. Besagte Kombination wurde neben den SH-Produktionsfolglich auch für alle Deletions- und Substitutionsstämme eingesetzt (Tabellen III.6, III.13).

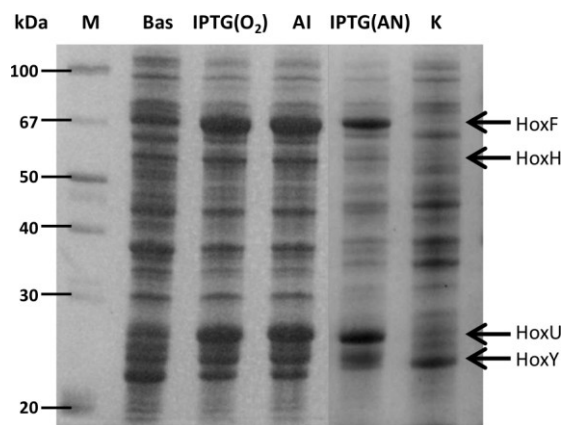


Tabelle III.5 – Induktionstechniken beim T7-basierten System und Anwendbarkeit auf die *Cn* Gene.

Induktionsart	Produktion	Löslichkeit	SH aktiv
Basale Expression	+	+++	+
IPTG Aerob	+++	–	–
IPTG Anaerob	++	+/-	–
Autoinduktion	+++	++	+++

(–): erfolglos; (+): mit mäßigem Erfolg; (++): mit deutlichem Erfolg; (+++): mit herausragendem Erfolg; (+/-): nicht einheitlich bestimmbar.

Abb. III.10 – SDS-PAGE Analyse zum Vergleich der T7-basierten Induktionsarten. Alle Induktionen (mit Ausnahme der Kontrolle) wurden mit *E. coli* BL21Star™ (DE3) K0 (pSH4.wt; Gene *hoxFUYH*) durchgeführt. Pro Laufspur wurden 25 µg Protein (Ganzzell-Lysat) bzw. 5 µL Marker aufgetragen (Gel: 12% PAA). M = Marker; Bas = Basale Expression; IPTG(O₂) = Aerobe Kultivierung mit IPTG Induktion; AI = Autoinduktion; IPTG(AN) = Anaerobe Kultivierung mit IPTG Induktion; K = Anaerobe Kontrolle (BL21Star™ ohne Plasmid; Anaerobe Kultivierung). Aus Gründen der Anschaulichkeit wurden zwei Gelbilder kombiniert.

Erwartungsgemäß hatten geringe Modifikationen der Kultivierungsbedingungen bei allen getesteten Expressionsstämmen substantielle Änderungen der resultierenden SH-Aktivität zur Folge. Um eine optimale Balance zwischen der i) Expressionsrate (Zugriffsmöglichkeit: Variation der C-Quellen; Temperatur), ii) Löslichkeit und Funktionalität der Genprodukte (Medienformulierung, Supplemente, Kultivierungsdauer und -temperatur), iii) Erhaltung der Stabilität funktional assemblierter SH (Einfluss auf zelluläre Redoxbedingungen durch O₂-Verfügbarkeit und Medienformulierung) sowie iv) Funktionalität des kompletten Reifungsapparats (Zugriffsmöglichkeiten analog Punkt ii) und iii)) zu erreichen, wurden Optimierungsversuche systematisch und sequentiell durchgeführt. Abb. III.11 stellt die wichtigsten Resultate dar. Die besten Ergebnisse wurden mit M9 Minimalmedium als Basis erzielt, welches folglich für weitere Optimierungsansätze verwendet wurde (Abb. III.11a). Die Konzentration der zur Autoinduktion eingesetzten C-Quellen stellte sich als wichtiges Regulationselement heraus. So konnte mit einem Verhältnis Glucose/Glycerin/Lactose (% w·v⁻¹/v·v⁻¹/w·v⁻¹) von 0,1/2/0,8 eine bis zu 2,5fache Erhöhung der Aktivität im Vergleich zu den von Studier vorgeschlagenen 0,05/1/0,2 [321] erreicht werden (Abb. III.11b). Als ebenso entscheidend erwies sich die Zugabe bestimmter Supplemente: Eisen (als Fe(III)-Ammonium-Citrat), Nickel (als NiCl₂) und Riboflavin stellten sich als essentielle Komponenten für eine erfolgreiche Reifung der SH heraus (Abb. III.11d). Da es sich bei der M9-Basis um ein Minimalmedium handelt, wirkte sich darüber hinaus die Supplementation eines Aminosäure-Mix vorteilhaft aus. Eine vergleichbare Wirkung konnte jedoch durch Zugabe von 5% (v/v) LB-Medium erreicht werden, welches daraufhin als günstigere Alternative fungierte.

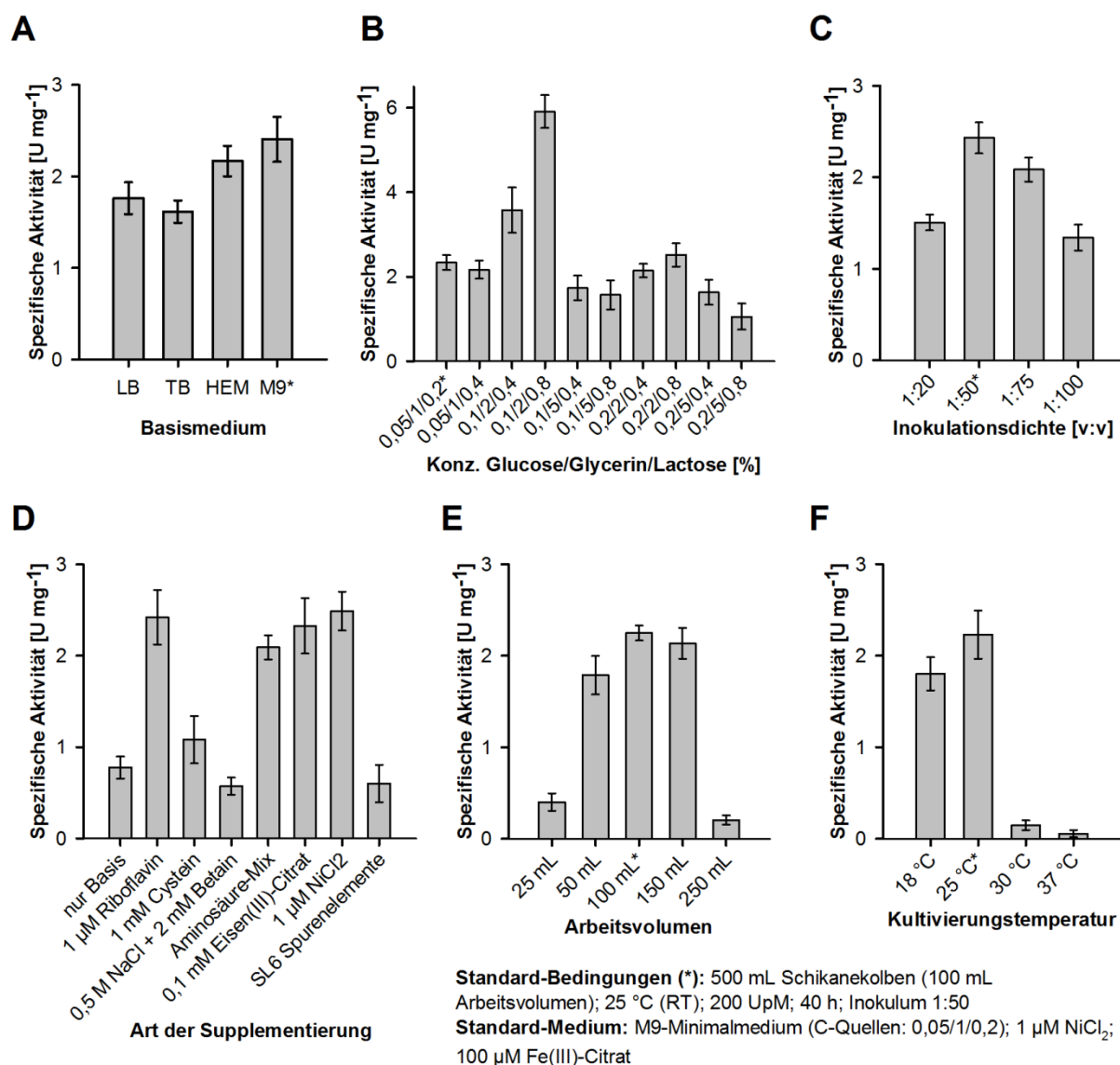


Abb. III.11 – Auswahl modifizierter Parameter für die Kultivierungsoptimierung rekombinanter *Ec* Stämme. In allen Experimenten wurde der Stamm K1A-HoxN1 (*E. coli* BL21Star™ (DE3) + pSH4.wt + pM1-hoxN1; siehe Tabelle III.6) eingesetzt. Alle Medien enthielten je 50 mg·L⁻¹ Kanamycin und Spectinomycin zur Selektion plasmidtragender Mikroben. Falls nicht gezielt modifiziert, wurden die im unteren Teil der Abbildung aufgeführten „Standard-Bedingungen“ der Autoinduktion (*) angewandt. Anmerkung zu den Einzel-Experimenten: **A**) Siehe „Standard-Medium“, jedoch mit den angegebenen Basismedien; **B**) Die angegebenen Kombinationen X/Y/Z geben die Konzentrationen von Glucose (% w/v) / Glycerin (% v/v) / Laktose (% w/v) im Medium an; **C**) Die angegebenen Zahlen geben das jeweilige Animpfverhältnis (v:v) an. Vorkulturen wurden in allen Fällen gemäß „Standard-Bedingungen“, jedoch ohne Laktose, angezogen. Zur Inokulation parallel getesteter Kulturen wurde stets eine gemeinsame Vorkultur verwendet; **D**) „nur Basis“ stellt das „Standard-Medium“, jedoch ohne NiCl₂ und Fe(III)-NH₄-Citrat dar. Die angegebenen Supplemente wurden dementsprechend dem „nur Basis“ Medium hinzugefügt. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass Zugabe von 5% (v/v) LB-Basismedium zur M9-basierten Kultur den gleichen Effekt wie die Supplementation des Aminosäure-Mix hatte; **E**) Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf das Kulturvolumen (= Arbeitsvolumen) innerhalb eines 500 mL Schikanekolbens; **F**) Die angegebene Temperatur wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant gehalten.

Bei Anwendung einheitlicher Kultivierungsbedingungen auf alle Expressionsstämme (Tabelle III.6) konnte ein deutlicher Effekt bei den Stämmen beobachtet werden, welche zusätzlich das

hoxN1 Gen beherbergten. Letzteres kodiert eine hochaffine Nickel-Permease HoxN1 aus *Cn* [238,240,241,317,318]. Innerhalb der ersten, unter ‚optimierten Bedingungen‘ getesteten Kultivierungen wurde eine durchschnittliche spezifische Aktivität des K1A-Stammes (pSH4.wt + pM1) von $1,95 \pm 0,24 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ erreicht, während diese bei Koexpression des *hoxN1* Gens (Stamm K1A-HoxN1; pSH4.wt + pM1-*hoxN1*) auf durchschnittlich $5,01 \pm 0,35 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ erhöht werden konnte. Diese Werte wurden bei beiden Stämmen unter Supplementation von $1 \mu\text{M NiCl}_2$ erreicht. Höhere Nickel-Konzentrationen führten, mit Ausnahme des HypA2B2-Deletionsstammes, zu einer Verringerung der Extrakt-Aktivität (Abb. III.12). HypAB-Komplexe beschleunigen nach bisherigem Verständnis die Nickel-Einschleusung in die Hydrogenase-Untereinheit. Wie anhand der hier dokumentierten Beobachtungen bestätigt, kann ihr Fehlen jedoch partiell durch eine Erhöhung der extrazellulären Nickel-Konzentration kompensiert werden (Abb. I.2 und Abschnitt IV.7).

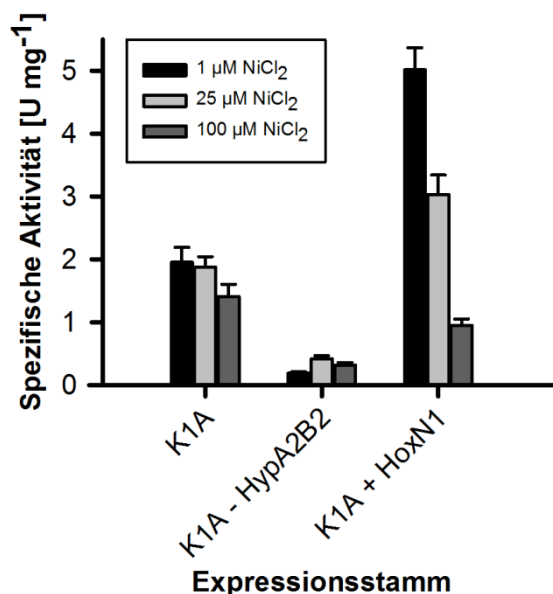


Abb. III.12 – Einfluss der NiCl_2 -Konzentration im Medium auf die SH-Aktivität ausgewählter Stämme. Die Kultivierung erfolgte unter „optimierten Bedingungen“ der Autoinduktion (Abschnitt II.2.1.2.2), jedoch unter Zugabe der angegebenen NiCl_2 -Konzentrationen zum Medium. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in zellfreien Extrakten, welche aus Zellen dreier unabhängiger Kultivierungsexperimente des jeweiligen Stammes hergestellt wurden, ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die Mittelwerte der drei unabhängigen Experimente sowie die daraus abgeleiteten Standardabweichungen (\pm) dar. Stämme: K1A (pSH4.wt + pM1), K1A $\Delta\text{HypA2B2}$ („K1A – HypA2B2“ mit Plasmid pM1 $\Delta\text{hypA2B2}$) sowie K1A-HoxN1 („K1A + HoxN1“ mit Plasmid pM1-*hoxN1*)

Bisherige Versuche zur Produktion rekombinanter $[\text{NiFe}]$ -Hydrogenasen in *E. coli* erfolgten stets unter strikt anaeroben Bedingungen [286-288,322]. Somit stellt diese Arbeit den ersten Ansatz zur aeroben Kultivierung und *in-vivo*-Reifung eines solchen Enzyms dar. Gleichwohl konnte anhand von Wachstumskurven (Abb. III.13), der Kultivierungsdauer, Schüttelrate und Zelldichte vermutet werden, dass während des Zeitraums optimaler Maturaseaktivität stets eher ein ‚quasi-anaerobes‘ Milieu vorlag. Die genaue Simulation derartiger Bedingungen erwies sich als komplex, was sich unmittelbar auf Versuche niederschlug, eine Hochskalierung des Kultivierungsprozesses zur Produktion funktionaler SH vorzunehmen. Durch schrittweise Modifikation der Kulturvolumina und Schüttel-/Rührraten konnten

folgende Parameter zur reproduzierbaren SH-Produktionskultivierung empirisch ermittelt werden: Das in Abb. III.13 gezeigte Wachstumsverhalten konnte sowohl im 500 mL Schikanekolben mit 100 mL Arbeitsvolumen und einer Schüttelrate von 180 UpM, als auch im 1000 mL Kolben mit einem maximalen Kulturvolumen von 550 mL und 200 UpM reproduziert werden. Für die reproduzierbare Übertragung des Schüttelkolben-Systems auf den 2-Liter-Fermenter wurden eine konstante Rührrate von 500 UpM sowie eine Begasung mit 1,2 vvm komprimierter Luft als Optima ermittelt. Das Arbeitsvolumen im Fermenter lag bei 1,5–1,8 Liter.

Durch Aufnahme von Wachstumskurven und Korrelation mit dem SH-Aktivitätsverlauf konnte ein kohärentes Bild der aktivsten Phase der Reifungsmaschinerie erzeugt werden (Abb. III.13a, Abschnitt IV.4). Um die O₂-Sättigung sowie weitere Prozessparameter *online* verfolgen zu können, erfolgte die Modellkultivierung in einem 2-Liter-Fermenter inklusive Kontrolleinheit. Der Prozess war vor Erreichen der stationären Phase durch zwei Verzögerungsphasen, ähnlich einem doppelten Diauxie-Verhalten („Triauxie“), gekennzeichnet (Abschnitt IV.4). Die hierbei relevanten Wachstumsphasen wurden innerhalb Abb. III.13a hervorgehoben (Diskussion Abschnitt IV.4). Die Produktion aller SH- und M1-Proteine schien bereits nach Phase III (20–24 h) abgeschlossen zu sein (Abb. III.13a,b). Demgegenüber erfolgte ein substantieller Anstieg der SH-Aktivität erst mit vierstündiger Verzögerung. Das optimale Fenster für die Aktivität des Reifungsapparats wurde demnach ab dem Beginn von Phase V verortet (Abb. III.13a). Etwa 38 Stunden nach Kultivierungs-Start konnte die maximale spezifische SH-Aktivität in Zellextrakten gemessen werden. Dies entsprach dem Zeitpunkt des SH-Aktivitätsmaximums im Schüttelkolben und ergab somit ein einheitliches Fenster für die optimale Zellernte nach 36–40 Stunden Kultivierungsdauer.

Als kritisch im Bezug auf die Reproduzierbarkeit des Aktivitätsmaximums und der SH-Gesamtausbeute erwies sich der Zustand der eingesetzten Vorkultur. Maximale und reproduzierbare Werte ließen sich erzielen, wenn die Über-Nacht-Kultur³ bei 25–30 °C und 200 UpM kultiviert wurde. Die Passage wurde durchgeführt, bevor eine optische Dichte (OD_{578,Vorkultur}) von 1 erreicht wurde. Spezifische Aktivitäten in Extrakten geernteter Zellen konnten auf diese Weise nochmals erhöht werden, resultierend in den in Tabelle III.6 angegebenen Durchschnittswerten. Die Zellausbeute bei Einhaltung des zuvor genannten optimalen Erntezeitraums lag bei 7–9 Gramm Zellfeuchtmasse pro Liter Kultur. Hierbei war im Falle der Schüttelkultur (Schikanekolben) die Ausbeute umso höher, je kleiner das Kulturvolumen unter Einhaltung der Skalierungsparameter gewählt wurde.

³ Vorkultur: üblicherweise 100 mL Arbeitsvolumen in 500 mL Schikanekolben; identische Medienzusammensetzung wie die Induktionskultur, jedoch ohne Laktose-Zugabe (siehe Abschnitt II.2.1.2.2).

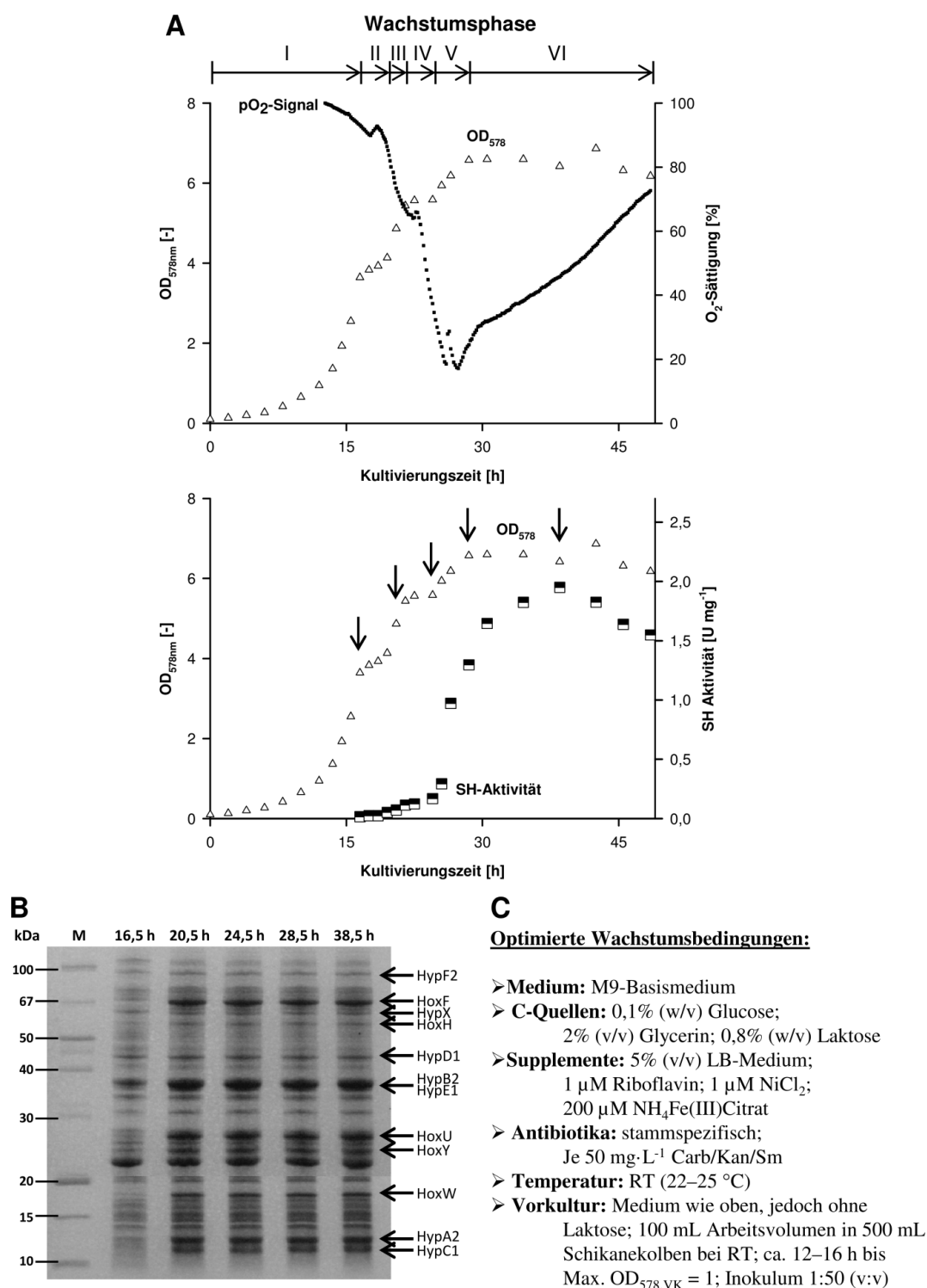


Abb. III.13 – Wachstumsverlauf von *E. coli* BL21Star™ (DE3) Stamm „K1A“ im 2 Liter Fermenter. Die Kultivierung erfolgte unter optimierten Wachstumsbedingungen (C), jedoch ohne die späteren Optimierungen hinsichtlich der Vorkultur. A) Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte, sowie der O_2 -Sättigung (als pO_2 -online Signal, relativ zur Anfangskalibrierung in MO -freiem Medium $\leftarrow 100\%$) und der spezifischen SH-Aktivität, welche nach Extrakterstellung der zu versch. Probenahme-Zeitpunkten geernteten Zellen ermittelt wurde. Die Wachstumsphasen I–VI sind im Diskussionsteil der Arbeit (Abschnitt IV.4) erläutert; B) SDS-PAGE-Analyse (kombiniertes Bild eines 12%- und eines 18%-PA-Gels) von Ganzzell-Lysaten von zu verschiedenen Probenahme-Zeitpunkten (über den Laufspuren angegeben und in (A) durch Pfeile kenntlich gemacht) geernteter Zellen. Pro Laufspur wurden 25 μ g Gesamtprotein bzw. 5 μ L Marker (M) aufgetragen. Die Größenbereiche der rekombinanten Genprodukte sind durch seitliche Pfeile markiert; C) Spezifikation der optimierten Wachstumsbedingungen, welche auf alle weiteren Studien zur Produktion rekombinanter SH angewandt wurden.

Koexpression des *hoxN1* Gens mit dem M1-Modul führte zu einer durchschnittlich 2,2–3,1fachen Erhöhung der Extraktaktivität für SH_{wt} (K1A/K1A-HoxN1), SH_{var1} (SH1F/SH1F-HoxN1) und SH_{var2} (SH2F/SH2F-HoxN1) Produktionsstämme (Tabelle III.6). Die maximal erreichten Aktivitäten für die einzelnen Varianten lagen bei $7,2 \pm 1,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{wt}; K1A-HoxN1), $6,8 \pm 1,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{var1}; SH1F-HoxN1) sowie $3,8 \pm 0,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{var2}; SH1F-HoxN1). Die geringere spezifische Aktivität der SH_{var2} war hierbei auf die hohe Abundanz des zusätzlich produzierten HoxI zurückzuführen, welches aufgrund seiner deutlich höheren Löslichkeit (verglichen mit den anderen Untereinheiten) den Anteil des Holoenzym im Zellextrakt dementsprechend herabsetzte. Hierzu sei auch auf Abschnitt III.3.2 verwiesen.

Tabelle III.6 – Auswahl der 10 wichtigsten in dieser Arbeit generierten SH-Produktionsstämme.
Einteilung: 1 = Hox'FUYH; 2 = HoxFUYH'I₂ ← ' = N-terminaler Tag.

SH Variante	Stamm ^a	Plasmide ^a	Heterologe Cn Gene ^a	Spezifische Aktivität [U·mg ⁻¹] ^b
Wildtyp	K1A	pSH4.wt + pM1	<i>hoxYHUF</i> // M1	3,2 ± 0,4
	K1A-HoxN1	pSH4.wt + pM1- <i>hoxN1</i>	<i>hoxYHUF</i> // M1 + <i>hoxN1</i>	7,2 ± 1,2
1 (5'StreptII-<i>hoxF</i>)	SH1F	pSH4.Strep + pM1	<i>hoxYHUF</i> (5'-StreptII) // M1	2,2 ± 0,2
	SH1F-HoxN1	pSH4.Strep + pM1- <i>hoxN1</i>	<i>hoxYHUF</i> (5'-StreptII) // M1 + <i>hoxN1</i>	6,8 ± 1,2
	SHdec1	pASGwt- <i>hoxUYH</i> + pM1- <i>hoxF</i> .Strep	<i>hoxYHU</i> // M1 + <i>hoxF</i> (5'-StreptII)	3,0 ± 0,6
	SHdec3	pASGwt- <i>hoxYH</i> + pM1- <i>hoxUF</i> .Strep	<i>hoxYH</i> // M1 + <i>hoxU</i> , <i>hoxF</i> (5'-StreptII)	1,3 ± 0,1
	NAES6.1	pA-SH4.Strep + pE-hypF2E1X <i>hoxW</i> + pS-hypC1D1A2B2	<i>hoxYHUF</i> (5'-StreptII) // <i>hypE1F1X</i> , <i>hoxW</i> (M1 I) // <i>hypC1D1A2B2</i> (M1 II)	0,98 ± 0,18
	NAES4.1	pA-SH4.Strep + pE.M1 + pM2	<i>hoxYHUF</i> (5'-StreptII) // M1 // M2	0,77 ± 0,08
2 (5'StreptII-<i>hoxI</i>)	SH2F	pSH6.Strep + pM1	<i>YHI</i> (5'-StreptII) <i>UF</i> // M1	1,7 ± 0,2
	SH2F-HoxN1	pSH6.Strep + pM1- <i>hoxN1</i>	<i>YHI</i> (5'-StreptII) <i>UF</i> // M1 + <i>hoxN1</i>	3,8 ± 0,3

^a Angaben zu Plasmid- und Genspezifikationen finden sich im Anhang dieser Arbeit (Tabelle VI.2).

^b 1 Unit (U) entspricht 1 μmol aus H₂-generiertem NADH pro Minute. Assays wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in zellfreien Extrakten, welche aus Zellen dreier unabhängiger Kultivierungsexperimente des jeweiligen Stammes hergestellt wurden, ermittelt. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente, sowie die sich daraus ergebenden Standardabweichungen (±) sind gezeigt. Alle Kultivierungen wurden bei RT für 40 h (Schikanekolben; 100 mL; 200 UpM) in M9-Medium (0,1% w/v Glucose; 2% v/v Glycerin; 0,8% w/v Laktose; Supplemente: Abschnitt II.1.5.1) vorgenommen.

Wie bereits in Abschnitt III.1.2.2 beschrieben, wurden zwei Stämme hergestellt, welche eine induktive Entkopplung der *hoxUYH/hoxYH*-Gene von den übrigen Genen erlauben sollten („SHdec“ Stämme; Tabelle III.6). Die Expression der Strukturgene wurde gemäß dieser Strategie erst nach 24 Stunden mit AHT induziert. Dies entsprach dem Zeitraum, in welchem sich das zelluläre Milieu den optimalen Bedingungen für die Reifungsmaschinerie annähert

und die M1-Genprodukte bereits vorliegen (Abb. III.13a). Die akzessorischen Gene wurden zusammen mit den komplettierenden Strukturgenen (*hoxF* bzw. *hoxFU*) als Teil der Laktose-Induktion (T7-Promotor; Autoinduktion) koexprimiert. Mit SH-Aktivitäten von $3,0 \pm 0,6$ bzw. $1,3 \pm 0,1 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ zeigten SHdec1 bzw. SHdec3 keine höheren SH-Aktivitäten als die optimierten Stämme mit uniformer Induktion (Tabelle III.6).

Plasmidkombination III (pA-, pE-, pS-Plasmide; NAES Stämme) eröffnete die Möglichkeit der Koexpression dreier unterschiedlicher Module in einer Zelle. NAES6.1 enthielt die gleichen *Cn* Gene wie Stamm SH1F (SH_{Var1} + M1), jedoch wurden die 12 Gene gleichmäßig auf die drei verfügbaren Plasmide verteilt. Auf diese Weise sollte folglich der Effekt erhöhter Gendosen getestet werden, da die SH Strukturgene auf einem *High-Copy*-Plasmid (RSF ori mit $>100 \text{ Kopien} \cdot \text{Zelle}^{-1}$), und das M1 Modul auf zwei Plasmiden (statt einem) vorlag. Die maximale spezifische Aktivität dieses Stammes lag bei $0,98 \pm 0,18 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ und damit deutlich unter der mit SH1F erreichten (Tabelle III.6). NAES4.1 stellte einen weiteren Stamm der Kombination III dar. Anhand der Koexpression von SH_{Var1}, M1 und M2 sollte hierbei die Kombination zweier vollständiger Reifungssätze (M1 & M2) untersucht werden. Aufgrund der zusätzlichen M2-Gene (*hypA3B3C2D2E2F3*) enthielt NAES4.1 damit eine Gesamtanzahl von 18 heterologen Genen. Jedoch lag die mit diesem Stamm erreichte spezifische SH-Aktivität deutlich unter der Kapazität vergleichbarer Expressionsstämme (maximale Aktivität NAES4.1: $0,77 \pm 0,08 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; Tabelle III.6). Daraus folgt der Schluss, dass offenbar keine Stimulierung der SH-Reifung durch den M2-Satz bei gleichzeitiger Anwesenheit des vollständigen M1-Satzes möglich ist. Die Fähigkeit des M2-Reifungssatzes zur funktionellen Komplementation des M1-Satzes wird detailliert in Abschnitt III.4 beleuchtet.

III.3 Reinigung und Charakterisierung der SH Varianten

Die SH ist eine der am besten untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen überhaupt. Seit 1970 wurde das Enzym mehrfach mit teilweise stark variierender Qualität gereinigt, sowie biochemisch und spektroskopisch charakterisiert [116,140,203,243-248,250,251,253,254,290-295,297-299,323-328]. Eine Begründung für die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten visuell homogener Präparationen wurde von Schneider *et al.* geliefert. Demnach enthalten Fraktionen mit vergleichsweise geringer Aktivität einen entsprechend hohen Anteil irreversibel inaktiver Enzym-Moleküle [251]. Van der Linden *et al.* entwickelten eine verbesserte Strategie zur SH-Isolierung, welche vor allem an zwei Stellen innerhalb der Reinigungsprozedur entscheidende Änderungen vornahm [203]: Sie verbesserten erstens die Qualität des Ausgangsmaterials durch eine optimierte Kultivierungsstrategie und ermittelten

darüber hinaus die optimalen Stabilisierungsbedingungen innerhalb der Zellsuspension und des zellfreien Extrakts vor dem ersten säulenchromatographischen Reinigungsschritt.

Für die SH wurde lange Zeit eine tetramere Struktur mit den Untereinheiten HoxFUYH angenommen. Im Jahre 2005 gelang schließlich die Identifizierung des nativen hexameren Aufbaus. Innerhalb diesem liegt ein zusätzliches Dimer HoxI₂ vor, welchem die Funktion einer NADPH-Aktivierungsstelle zugesprochen wird ([243] und diese Arbeit). HoxI₂ ist mit dem Diaphorase-Modul HoxFU assoziiert. Die Stärke der HoxI₂-Bindung an die tetramere SH ist stark von den vorliegenden Pufferbedingungen abhängig. Unter bestimmten Bedingungen (pH>7,0 oder erhöhte Ionenstärke) löst sich das Homodimer ab, während das HoxFUYH-Tetramer unter diesen Bedingungen stabil ist. Sowohl HoxF als auch HoxI können ohne Verlust der Enzym-Funktionalität am N-Terminus mit einem StrepII-Tag fusioniert werden, was eine erleichterte Reinigung beider Enzymvarianten erlaubt.

III.3.1 Reinigung der hexameren Wildtyp-SH aus *Cn*

Zur Gegenüberstellung mit Präparationen rekombinanter SH-Varianten sollte das native Enzym zunächst in vergleichbarer Qualität aus *Cn* isoliert werden. Um eine möglichst hohe Qualität der Präparation zu erreichen, wurde hierbei hochaktives Ausgangsmaterial eingesetzt. Abschnitt III.2.1 stellt die zu diesem Zweck vorgenommenen Optimierungsexperimente dar. Unter Einsatz des dabei gewonnenen Ausgangsmaterials und der Adaption bereits optimierter Bedingungen [203] konnte die hexamere SH daraufhin mit hoher spezifischer Aktivität isoliert werden. Aus etwa 20 Gramm *Cn* Zellen konnten 17 mg des Enzyms mit einer spezifischen Aktivität von 130 U·mg⁻¹ isoliert werden (Abb. III.14 und Tabelle III.7).

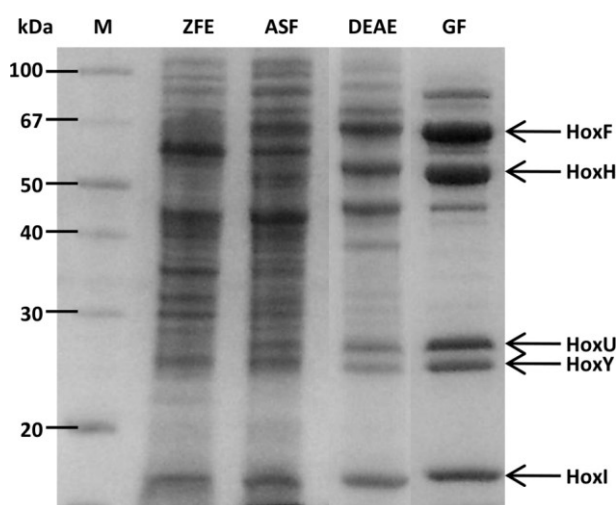


Abb. III.14 – Darstellung des Reinigungsverlaufs nativer hexamerer SH aus *Cn*. Proben (25 µg Gesamtprotein bei ZFE und ASF; 5 µg bei DEAE und GF; 5 µL Marker) wurden via 12% PA-SDS-GE aufgetrennt. Das Bild wurde zwischen mehreren Spuren geschnitten, um irrelevante Bereiche zu entfernen. M = Marker; ZFE = Zellfreier Extrakt; ASF = Präzipitierter Proteinanteil aus der fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung (35–60%), rückgelöst in 50 mM KPi pH 7,0 und dialysiert gegen den gleichen Puffer; DEAE = Gepoolte und konzentrierte Fraktion nach der Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sepharose); GF = Gepoolte, konzentrierte Fraktion nach der Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration auf Superdex 200).

Dies entspricht der zweithöchsten bisher erreichten Aktivität des nativen Enzyms aus *Cn* (202 U·mg⁻¹; [203]). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die chromatographischen Schritte in dieser Arbeit aufgrund der gegebenen Infrastruktur bei Raumtemperatur durchgeführt wurden, wodurch ein Teil der Enzym-Moleküle möglicherweise inaktiviert wurde.

Tabelle III.7 – Daten zur Reinigung der hexameren Wildtyp-SH aus *Cupriavidus necator*.

Reinigungsschritt	m(Protein) [mg]	Aktivität [U] ^b	Spez. Aktivität [U·mg ⁻¹] ^b	Anreicherungs- faktor	Ausbeute
Zellfreier Extrakt	1.361 ^a	10.903	8,0	1	100%
ASF 60% Pellet	671	8.529	13	1,6	78%
DEAE Sepharose	69	5.828	84	11	53%
Gelfiltration	17	2.195	130	16	20%

^a Es wurden ca. 20 Gramm Zellfeuchtmasse als Ausgangsmaterial eingesetzt.

^b 1 Unit ist definiert als die anaerobe H₂-abhängige Reduktion von 1 µmol NAD⁺ pro Minute.

ASF = Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung (35–60%); DEAE = Diethylaminoethyl (Anionenaustauscher).

III.3.2 Reinigung der rekombinanten SH Varianten

Die Reinigung der rekombinanten tetrameren bzw. hexameren SH-Varianten erfolgte mittels StrepTactin Affinitätschromatographie. Zu diesem Zweck wurde entweder HoxF (SH_{Var1}) oder HoxI (SH_{Var2}) am N-Terminus mit einem StrepII-Tag fusioniert (Tabelle III.6). Ein Einfluss des Tags auf die Stabilität des SH-Enzymkomplexes konnte hierbei, analog der Literaturbeschreibung [243], nicht festgestellt werden. Die verringerte Aktivität der SH_{Var2}-Expressionsstämme (SH2F, SH2F-HoxN1) gegenüber den SH_{Var1}-Stämmen liegt in der hohen Löslichkeit der HoxI-Untereinheit begründet (siehe auch Abb. III.20f), so dass dieses einen beträchtlichen Teil der löslichen Proteinfraction bildet und die spezifische SH-Aktivität dementsprechend absenkt. Als Konsequenz musste der Überschuss an freiem HoxI in den aus der Affinitätschromatographie stammenden Fraktionen durch einen nachfolgenden Feinreinigungsschritt mittels Gelfiltration abgetrennt werden. Da erst gegen Ende der Arbeit die vollständige Optimierung der Kultivierungs-/Expressionsstrategie abgeschlossen war, waren anfängliche Reinigungsversuche durch fehlende Reproduzierbarkeit gekennzeichnet. Die Qualität des Ausgangsmaterials hatte einen großen Einfluss auf die Stabilität des Enzymkomplexes, was im Falle der hexameren SH_{Var2} in Form einer Dissoziation des HoxYH-Dimers beobachtet werden konnte. Dies resultierte nach Überschreiten des optimalen Erntezeitraums (ca. 36–40 h; Abb. III.13a) in der Isolierung überstöchiometrischer Mengen des HoxFUI₂ Diaphorase-Komplexes (Abb. III.15a). Im Falle der tetrameren Variante konnte eine derartige Destabilisierung nicht beobachtet werden. Die SH_{Var2} war darüber hinaus

instabil gegenüber Erhöhungen der Ionenstärke während der säulenchromatographischen Schritte. Ein zusätzlicher Waschschriff mit Basispuffer inkl. 150 mM KCl führte zur Elution des hexameren Enzyms. Innerhalb dieser Fraktion (Abb. III.15b, WX) hatte sich StrepII-HoxI offenbar vollständig von HoxFUYH abgelöst, da das oxidierte Enzym nicht länger mit NADPH aktiviert werden konnte. Die Dissoziation von SH-gebundenem HoxI erfolgte auch bei Änderung der Pufferbasis. Unter Bedingungen der Nativ-PAGE beispielsweise konnte eine Abtrennung von HoxFUYH beobachtet werden (Abb. III.16a). Der tetramere Komplex erwies sich als unter diesen Bedingungen stabil, was sich anhand einer denaturierenden Auflösung des kompakten, stöchiometrischen HoxFUYH-Komplexes in der zweiten Dimension nachweisen ließ (Abb. III.16b,c).

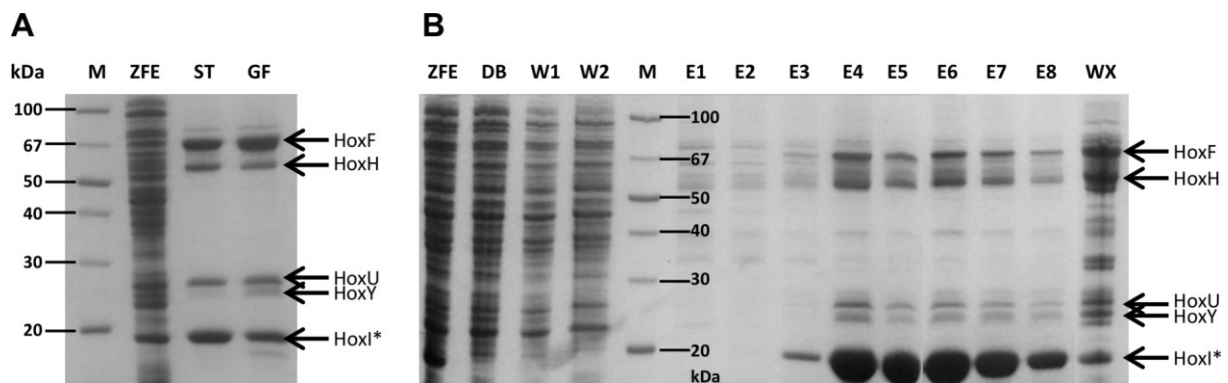


Abb. III.15 – Beispiele für Präparationen geringerer Qualität der SH_{var2} mit potentiellen Fehlerquellen. (A) zeigt die Reinigungsschritte des Enzyms (aus Zellen des Stamms SH2F), bei der die Ausgangszellen (1 g Zellfeuchtmasse) erst nach 44 Stunden Kultivierung geerntet wurden. Die Reinigung erfolgte mit einer StrepTactin Sepharose (1 mL) Gravity Flow Säule. Elutionsfraktionen wurden gepoolt, konzentriert (ST) und anschließend mittels einer Superdex 200 HR 10/300 Gelfiltrationssäule der Feinreinigung unterzogen (GF). Deutlich zu erkennen ist der unterstöchiometrische Anteil des HoxYH-Moduls, resultierend aus der Destabilisierung des hexameren Enzyms. (B) zeigt die Fraktionen bei Reinigung des Enzyms (Stamm SH2F; Ernte nach 38 h) unter suboptimalen Bedingungen. Der Waschvorgang erfolgte durch zwei Säulenvolumen (SV) mit 50 mM KPi pH 7,0, gefolgt von einem SV mit 50 mM KPi Puffer pH 7,0 + 150 mM KCl [konzentriert und als letzte Laufspur aufgetragen (WX)]. Zu erkennen ist die höhere Kontamination der Elutionsfraktionen durch unzureichende Waschschriffe, sowie der Auswascheffekt durch Applikation des KCl-Waschpuffers (WX). Proteinproben (25 µg Gesamtprotein bei ZFE, DB; 5 µg bei ST und GF; 10 µg bei WX; je 25 µL pro Wasch- bzw. Elutionsfraktion; 5 µL Marker) wurden via 12% PAA-SDS-GE aufgetrennt. M = Marker; ZFE = Zellfreier Extrakt; ST = Eluat-Pool aus der StrepTactin Affinitätschromatographie; GF = Gelfiltration; DB = Durchbruch; W = Waschrfrkt.; E = Elutionsfrkt.; WX = Konzentrierte Waschrfraktion 3 (+ KCl); HoxI* = StrepII-HoxI.

Wie eingangs dieses Kapitels bereits erwähnt, stellten sich die Schritte vor Beladen der Säule im Falle der SH als entscheidend für die spätere Qualität der Präparation heraus. Unter Berücksichtigung der gegebenen Infrastruktur konnte Gefrieren/Auftauen als optimale Aufschlussmethode ermittelt werden. Durch bis zu sechs Zyklen konnte (mikroskopisch verfolgt) ein nahezu 100%iger Aufschlussgrad erreicht werden. Initiale spezifische

Aktivitäten und Stabilitäten lagen hierbei deutlich höher als bei Anwendung des Ultraschallaufschlusses. Die in [203] vorgestellten optimierten Strategien zur Kontrolle der Redoxbedingungen erwiesen sich auch für die rekombinanten Varianten als vorteilhaft hinsichtlich der Enzymstabilität. Gemäß dieser Strategie wurde der Aufschlusspuffer mit 50 mM Succinat versetzt, resultierend in dem Verbrauch des restlichen Gelöst-O₂ durch die Aktivität der vorhandenen Membranvesikel. Dies verhindert zusätzlich ein niedrigeres Redoxpotential, welches der SH-Stabilität nicht zuträglich ist ([203] und Tabelle VI.3). Während der Aufschluss- und Ultrazentrifugations-Schritte wurden die Suspensionen einer Argon-Atmosphäre ausgesetzt. Tabelle III.8 liefert eine Übersicht zu den methodischen Schritten zur Generierung optimierter, reproduzierbarer und hochaktiver SH-Präparationen.

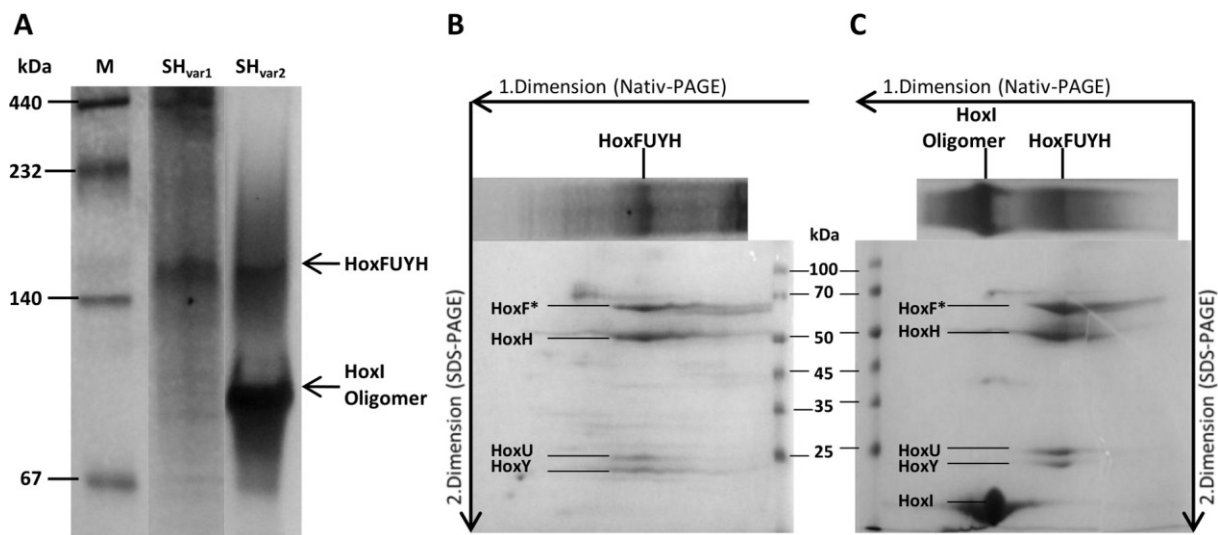


Abb. III.16 – Nativ- und 2D-PAGE von partiell gereinigten rekombinanten SH Varianten. (A) 3–15% PA-Nativgel mit 5 µg (SH_{var1}) bzw. 15 µg (SH_{var2}) geladenem Protein. Die markierte tetramere Wildtyp-Form der SH (HoxFUYH) hat gemäß [243] eine kalkulierte molekulare Masse von 167 kDa (gemäß analytischer Gelfiltration in dieser Arbeit: 171 kDa; Abb. III.18). Das HoxI-Oligomer könnte ein Homotetramer (ca. 80 kDa) darstellen. Standards: Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Lactat-Dehydrogenase (140 kDa), BSA (67 kDa). Die Laufspuren der SH_{var1} (B) bzw. SH_{var2} (C) wurden ausgeschnitten und in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE (12% PA) analysiert. Aus der Kombination der drei Bilder ist die Schlussfolgerung möglich, dass die HoxI-Untereinheit unter den Nativ-PAGE Pufferbedingungen den Komplex vollständig verlässt.

Die in Tabelle III.6 angegebenen spezifischen Extrakt-Aktivitäten - insbesondere der *hoxNI* beherbergenden Expressionsstämme – wurden erst im späteren Verlauf der Arbeit erreicht. Die nachfolgend vorgestellten Präparationen wurden daher unter Berücksichtigung der in Tabelle III.8 gelisteten Optimierungen, jedoch mit Ausgangsmaterial geringerer Aktivität erzielt (Stämme: SH1F für SH_{var1}, SH2F für SH_{var2}). Abb. III.17 und die Tabellen III.9 und III.10 stellen die Ergebnisse dar. Der Fokus dieser Reinigungen lag im Gegensatz zur

Isolierung des Wildtyp-Enzyms (Abschnitt III.3.1) nicht auf Ausbeute sondern auf maximaler Reinheit. Die SH-Varianten konnten mit spezifischen Aktivitäten von $192 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{Var1}) bzw. $227 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{Var2}) isoliert werden. Im Falle der hexameren SH Variante 2 stellt dies die höchste bislang erreichte spezifische Aktivität dar (bisheriger Wert [203]: $202 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Tabelle III.8 – Übersicht über Optimierungsschritte zur Reinigung der rekombinanten SH Varianten.

	Tetramere SH Variante 1 (StrepII-HoxF, HoxUYH)	Hexamere SH Variante 2 (StrepII-HoxI, HoxFUYH)
Extraktherstellung		
Aufschlusspuffer	1–4 mL · (g Zellfeuchtmasse) ⁻¹ 50 mM KPi pH 7,0 + 50 mM Succinat + 5 mM MgCl ₂ + DNase/RNase + Avidin + 2 µM FMN + 0,05 mM PMSF; <u>Anmerkung:</u> Weitere Erhöhung der Ionenstärke führt zur Verringerung der Ausbeute.	
Aufschlussart	Ultraschall-, Toluol- und Lysozymaufschluss führt zu Aktivitätsverlust sowohl unter Argon, O ₂ als auch Luft; <u>ideal:</u> Gefrieren/Auftauen 3–6 Zyklen (30 min -80 °C / 15 min 25 °C) in 1,5 mL Aliquots unter Argon	
Verdünnung	Enzym bleibt bei moderater Extraktverdünnung stabil; Reinigungserfolg jedoch umso besser, je konzentrierter der geladene Extrakt	Starke Extraktverdünnung führt zu Aktivitätsverlust durch Destabilisierung der hexameren Struktur (HoxYH löst sich von HoxFUI ₂ ab)
Säulenschritte		
StrepTactin Matrix	<u>Sepharose:</u> schlechte Bindung an die Säule; <u>MacroPrep:</u> gute Bindung, Fraktionen sind jedoch unsauber; <u>Superflow:</u> gute Bindung, optimaler Reinigungserfolg	
Säulenart	Gravity Flow liefert maximale Ausbeute (hohe Verweilzeit); Enzym wird bei HPR (+ Peristaltikpumpe) teils ausgewaschen	Gravity Flow liefert maximale Ausbeute (hohe Verweilzeit); HPR möglich, resultiert jedoch in geringerer Reinheit der Präp.
Waschpuffer	Zugabe von bis zu 150 mM KCl (nicht NaCl !) zum Waschpuffer verbessert die Reinheit der Präparation	Erhöhung der Ionenstärke nicht empfohlen, da diese zur Destabilisierung und zur Ablösung des HoxI ₂ Dimers führt
Temperatur	Enzym ist innerhalb des Extrakts thermolabil; Reinigung bei 4 °C führt zu deutlich besseren Reinigungsergebnissen als bei Raumtemperatur	
Gelfiltration	Schritt nötig v.a. zur Entfernung von Rest-Kontaminanten	Schritt nötig v.a. zur Entfernung von überschüssigem StrepII-HoxI

StrepII-HoxI zeigte im Verbund mit dem nativen SH-Komplex eine deutlich stärkere Bindung an StrepTactin als StrepII-HoxF. Erhöhungen der Waschvolumina oder der Fließrate führten im Falle der SH_{Var1} daher bereits zum Auswaschen eines Teils des gebundenen Enzyms. Daraus resultierte eine deutlich höhere Ausbeute für die SH_{Var2} (Tabelle III.10). 5–8 Gramm Zellfeuchtmasse wurden in beiden hier gezeigten Fällen als Ausgangsmaterial eingesetzt. Dies entspricht der Zellmenge, welche üblicherweise aus 600 mL Autoinduktions-Kultur erhalten wird. Folglich liegt die erzielte Ausbeute hochreiner SH für beide Varianten im Milligramm-Bereich pro Liter Kultur. Aufgrund der im späteren Verlauf der Arbeit erreichten höheren spezifischen Aktivitäten der SH-Produktionsstämme (Tabelle III.6) kann angenommen werden, dass die Ausbeute der hier gezeigten Reinigungen noch nicht der maximalen Kapazität des Systems entspricht.

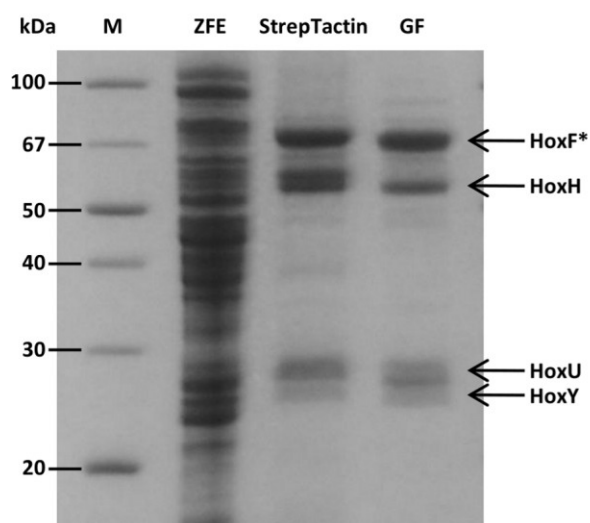
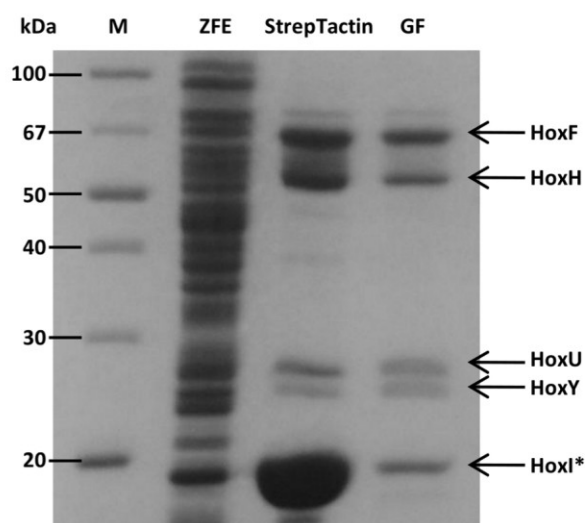
A – Tetramere SH Variante 1**B – Hexamere SH Variante 2**

Abb. III.17 – Darstellung des Reinigungsverlaufs der beiden rekombinanten SH Varianten. Proben (25 µg Gesamtprotein bei ZFE; 5 µg bei allen Fraktionen mit Ausnahme der ‚StrepTactin‘ Fraktion in B; dort 15 µg; 5 µL Marker) wurden via 12% PAA-SDS-GE aufgetrennt. M = Marker; ZFE = Zellfreier Extrakt; StrepTactin = Gepoolte und konzentrierte Fraktion nach der Affinitäts-Chromatographie; GF = Gepoolte und konzentrierte Fraktion nach der Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration). HoxF* = StrepII-HoxF; HoxI* = StrepII-HoxI. Spezifische Aktivitäten sind in den Tabellen III.9 und III.10 dokumentiert. Bei der in (A) sichtbaren geringeren Auflösung von HoxU und HoxY handelt es sich um ein methodisches (Gelherstellung oder elektrophoretischer Lauf) und nicht ein Proben-bezogenes Problem. In Abb. III.18 ist die GF-Probe erneut und mit besserer Auflösung visualisiert.

Tabelle III.9 – Daten zur Reinigung der rekombinanten tetrameren SH Variante 1 aus Stamm „SH1F“.

Reinigungsschritt	m(Protein) [mg]	Aktivität [U] ^b	Spez. Aktivität [U·mg ⁻¹] ^b	Anreicherungs- faktor	Ausbeute
Zellfreier Extrakt	1.825 ^a	1.810	1,0	1	100%
Strep-Tactin Superflow	5	329	67	67	18%
Gelfiltration	0,7 ^c	125	192	193	7% ^c

^a Es wurden ca. 6 Gramm Zellfeuchtmasse (aus 600 mL Kultur) als Ausgangsmaterial eingesetzt.

^b 1 Unit ist definiert als die anaerobe H₂-abhängige Reduktion von 1 µmol NAD⁺ pro Minute.

^c Bei der hier vorgestellten Reinigung lag der Fokus vollständig auf Reinheit. Folglich wurden lediglich die aktivsten Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie in die Berechnung mit einbezogen.

Tabelle III.10 – Daten zur Reinigung der rekombinanten hexameren SH Variante 2 aus Stamm „SH2F“.

Reinigungsschritt	m(Protein) [mg]	Aktivität [U] ^b	Spez. Aktivität [U·mg ⁻¹] ^b	Anreicherungs- faktor	Ausbeute
Zellfreier Extrakt	2.276 ^a	2.754	1,2	1	100%
Strep-Tactin Superflow	45	885	19	16	32%
Gelfiltration	2,7 ^c	604	227	187	22% ^c

^a Es wurden ca. 7 Gramm Zellfeuchtmasse (aus 600 mL Kultur) als Ausgangsmaterial eingesetzt.

^b 1 Unit ist definiert als die anaerobe H₂-abhängige Reduktion von 1 µmol NAD⁺ pro Minute.

^c Bei der hier vorgestellten Reinigung lag der Fokus vollständig auf Reinheit. Folglich wurden lediglich die aktivsten Fraktionen der Größenausschluss-Chromatographie in die Berechnung mit einbezogen.

III.3.3 Eigenschaften der gereinigten SH Varianten

Die Wildtyp-SH sowie die rekombinanten Varianten (Abb. III.18a) wurden einer vergleichenden Charakterisierung hinsichtlich katalytischer Aktivität, Aktivierung des oxidierten Enzyms, Stabilität und spektroskopischer Eigenschaften (UV/Vis) unterzogen. Mittels analytischer Gelfiltration wurden für die rekombinanten Enzyme molekulare Massen von 171 (tetramere SH_{var1}) bzw. 213 kDa (hexamere SH_{var2}) ermittelt (Abb. III.18b). Dies deckt sich mit den aus Aminosäuresequenzen kalkulierten Werten (170 bzw. 208 kDa) und den von Burgdorf *et al.* angegebenen Werten, bei denen die Masse des StrepII-Peptids nicht berücksichtigt wurde (167 bzw. 205 kDa [243]). Für das Wildtyp-Enzym ist in der Literatur eine empirisch ermittelte molekulare Masse von 205 kDa angegeben [140].

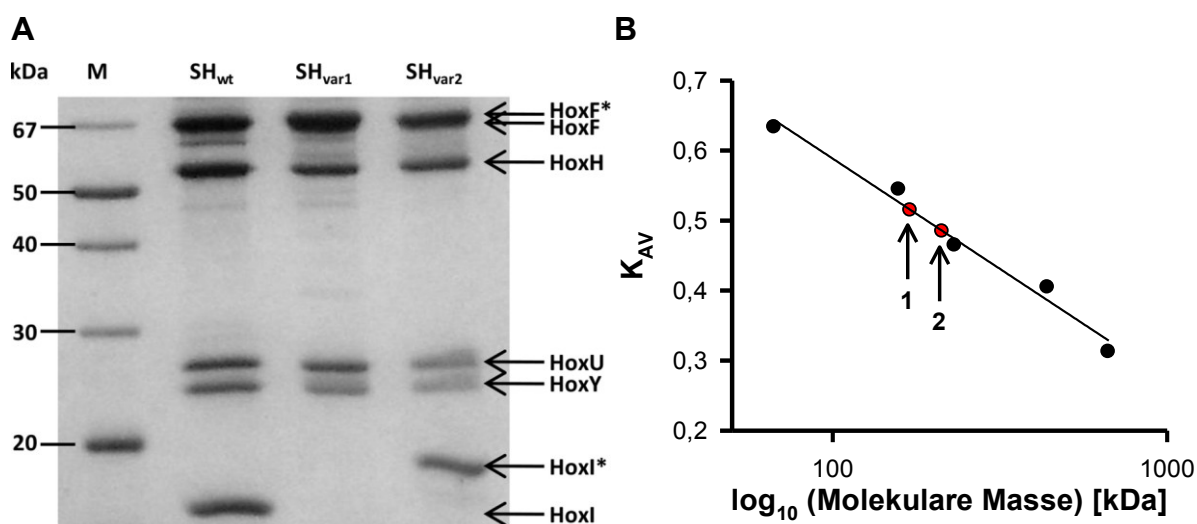


Abb. III.18 – Darstellung der drei gereinigten SH Varianten sowie Bestimmung der molekularen Massen. (A) zeigt die SDS-PAGE Analyse der in den Abschnitten III.3.1 und III.3.2 vorgestellten Präparationen. Proben (5 µg der Enzyme bzw. 5 µL Marker) wurden via 12% PAA-SDS-GE aufgetrennt. M = Marker; SH_{wt} = HoxFUYHI₂ aus *Cn*; SH_{var1} = HoxF*UYH mit StrepII-HoxF (HoxF*); SH_{var2} = HoxFUYHI₂ mit StrepII-HoxI₂ (HoxI*). (B) zeigt die Kalibration zur Bestimmung molekularer Massen mithilfe der Gelfiltration auf einer logarithmischen Skalierung. Kalibrierstandards und analytische Proben wurden mit einer Superdex 200 HR 10/300 Gelfiltrations-Säule, äquilibriert mit 50 mM KPi Puffer pH 7.0, analysiert. Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa) und BSA (67 kDa) wurden als Standards verwendet. Über den Fit $K_{AV} = -0,137 \cdot \ln(MW) + 1,2185$ ($R^2 = 0,982$) wurden für die beiden rekombinanten SH Varianten (rot hervorgehoben) molekulare Massen von 171 kDa (1, tetramere SH_{var1}; $K_{AV} = 0,514$) und 213 kDa (2, hexamere SH_{var2}; $K_{AV} = 0,484$) bestimmt.

Kolorimetrische Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen in Präparationen der drei gereinigten Varianten lieferte Werte von 16–19 (SH_{wt}), 15–17 (SH_{var1}) bzw. 15–18 (SH_{var2}) Mol Eisen pro Mol Enzym. Aus der Präsenz konservierter FeS-Cluster-Koordinationsstellen innerhalb der Aminosäuresequenz der SH-Untereinheiten kann auf insgesamt vier [4Fe-4S]- (je eins in

HoxY und HoxF und zwei in HoxU) und ein [2Fe-2S]-Cluster (ebenfalls HoxU) geschlossen werden [221,247]. Kombiniert mit dem Eisenatom des aktiven Zentrums kann somit ein theoretischer Wert von 19 Mol Eisen pro Mol SH vorausgesagt werden. Die bisher empirisch ermittelten Werte lagen knapp [247] oder deutlich [250,325] unter diesem theoretischen Wert. Die SH bindet zwei Flavin-Kofaktoren (FMN-a in HoxY und FMN-b in HoxF; Abschnitt I.3.3). Die Präsenz sowohl von FMN als auch der FeS-Cluster wurde mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie bestätigt (Abb. III.19). Absorptionsmaxima im Bereich von 325 bzw. 378 nm sowie 420 bzw. 475 nm wiesen hierbei auf die Anwesenheit der [2Fe-2S]- bzw. [4Fe-4S]-Cluster hin (Abb. III.19a; [329-331]). Nach Reduktion des Enzyms mit einem Überschuss Dithionit wurde ein Differenzspektrum aufgenommen, welches auf zusätzliche Maxima im Bereich von 370–390 nm sowie 450–460 nm schließen lässt (Abb. III.19b). Dies deutet neben der zusätzlichen Absorption der [4Fe-4S]-Cluster im Bereich von ca. 380 nm auf die Anwesenheit oxidierter Flavin-Kofaktoren hin [332,333].

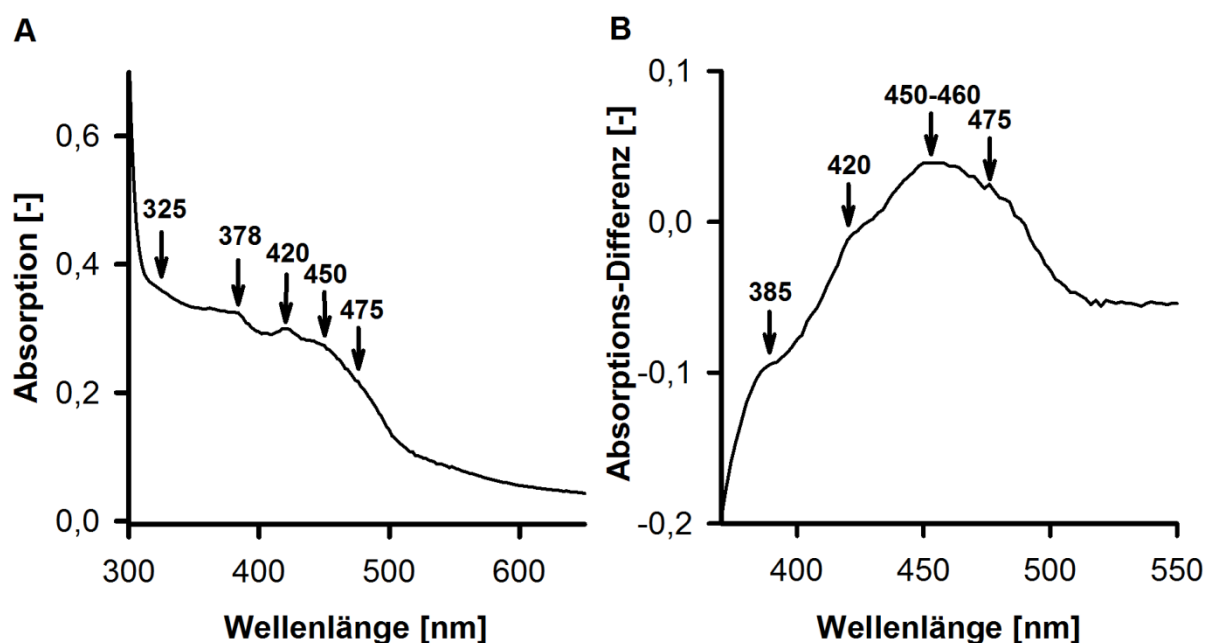


Abb. III.19 – UV/Vis spektroskopische Analyse der rekombinanten SH Variante 2. (A) zeigt das Spektrum des gereinigten oxidierten Enzyms ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) im Bereich 300–650 nm mit den im Text erläuterten relevanten Absorptionsmaxima bzw. -schultern. (B) zeigt das Differenzspektrum des oxidierten minus dem des reduzierten (0,5 mM Dithionit) Enzyms im Bereich 350–550 nm mit den im Text erläuterten relevanten Absorptionsmaxima.

Als probate Methode zur Ermittlung der vollständigen und korrekten Assemblierung des SH-Holoenzym kann die Messung der physiologischen Aktivität ($\text{H}_2\text{:NAD}^+$), welche die Anwesenheit der HoxFUYH Untereinheiten, ihrer FeS-Cluster und beider FMN-Kofaktoren voraussetzt, eingesetzt werden [246]. Da die O_2 -Toleranz ein entscheidendes

Charakteristikum der SH darstellt, sind aerobe Messungen der physiologischen Aktivität darüber hinaus ein gängiges Mittel zur Feststellung der Qualität verschiedener SH-Präparationen [203]. Hierfür kann ebenfalls das Aktivierungsverhalten der oxidierten tetrameren und hexameren SH unter sowohl anaeroben als auch aeroben Assay-Bedingungen herangezogen werden. Die qualitativ hochwertigsten Präparationen aller drei in dieser Arbeit gereinigten Varianten (Abschnitte III.3.1 und III.3.2) zeigten vergleichbare Aktivierungseigenschaften mit der Ausnahme, dass eine Aktivierung der tetrameren SH_{Var1} mit NADPH nicht möglich war (Anhang, Tabelle VI.4). Dies bestätigt die These, dass HoxI als spezifische Aktivierungsstelle für NADPH fungiert [243]. Alle Varianten katalysierten H₂-Oxidation unter aeroben Bedingungen mit spezifischen Aktivitäten, welche gegenüber anaeroben Messungen um ca. 20–25% reduziert waren (Tabellen III.10 und VI.4). In Abwesenheit eines Aktivators (üblicherweise 5 µM NADH bei beiden Varianten oder 40 µM NADPH bei hexamerer Variante) konnte in jedem Falle eine „lag-Phase“ vor Erreichen des maximalen Absorptionsanstiegs beobachtet werden (Tabelle III.11 und VI.4; [140,202]). Diese war umso geringer ausgeprägt, je höher die Qualität (spezifische Aktivität) der Präparation war. Eine vergleichende Analyse verschiedener Präparationen hinsichtlich des anaeroben und aeroben Aktivierungsverhaltens ist Teil der Diskussion (Abschnitt IV.5).

Die rekombinanten SH Varianten waren außerordentlich stabil bei Lagerung unter Luft. Nach sechs Monaten bei -20 °C (unter Zugabe von 5% (v/v) Glycerin) konnte für alle Varianten über 75% Restaktivität gemessen werden. Bei -80 °C war über diesen Zeitraum sogar nahezu kein Verlust gegenüber der Anfangsaktivität festzustellen (Tabelle III.11). Bei Lagerung unter Formiergas-Atmosphäre auf Eis (2–5% H₂, Rest N₂) waren alle Varianten vergleichsweise instabil und zeigten Halbwertszeiten von wenigen Stunden. Zugabe von NADH unter diesen Bedingungen beschleunigte die irreversible Inaktivierung und führte zu komplettem Aktivitätsverlust binnen 40 Minuten (Tabelle III.11). Zusammengefasst entsprachen die rekombinanten SH Varianten der in dieser Arbeit gereinigten Wildtyp-SH hinsichtlich der untersuchten Merkmale. Die vorgestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit den literaturbeschriebenen Charakteristika des Enzyms ([140] und Abschnitt IV.5).

Innerhalb des zellfreien *E. coli* Extrakts waren die rekombinanten Varianten vergleichsweise instabil. In unbehandeltem, luftgesättigtem Extrakt lag die Halbwertszeit von SH_{Var1} und SH_{Var2} bei ca. einer Stunde (Tabelle III.11). Die Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF (0,05–0,1 mM) bewirkte keinerlei Veränderung dieses Inaktivierungsverhaltens. Demgegenüber konnte in *Cn* Extrakt selbst nach 24 Stunden auf Eis noch Restaktivität gemessen werden. Durch Anpassung der Redoxbedingungen wie in Abschnitt III.3.2 beschrieben (Zugabe von

50 mM Succinat zum Aufschlusspuffer, sowie Erhaltung einer Argon-Atmosphäre vor dem ersten Säulenschritt) konnte die Stabilität innerhalb der Extrakte deutlich erhöht werden (Tabellen III.11 und VI.3). Dadurch erhöhte sich die Halbwertszeit der rekombinanten SH Varianten auf 3,5 Stunden (Tabelle III.11), so dass ein deutlich größerer Anteil der den ersten Reinigungsschritt passierenden Enzym-Moleküle in der aktiven Form isoliert werden konnte.

Tabelle III.11 – Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der Wildtyp- und rekombinanten SH-Varianten.

Eigenschaft	SH_{wt} (<i>Cn</i>)	SH_{Var1} (<i>Ec</i> SH1F)	SH_{Var2} (<i>Ec</i> SH2F)
ZFE-Stabilität (Eis; KPi Puffer; Luftgesättigt)	$t_{1/2} = 12 \text{ h}^a$		$t_{1/2} = 1,1 \text{ h}^a$
ZFE-Stabilität (Eis; KPi Puffer + 50 mM Succinat unter Argon)	$t_{1/2} = 24 \text{ h}^a$		$t_{1/2} = 3,5 \text{ h}^a$
Stabilität gereinigte Variante (-20 °C) ^b	6 Monate: >80%	6 Monate: >75%	6 Monate: >75%
Stabilität gereinigte Variante (-80 °C) ^b		6 Monate: >90%	
Stabilität gereinigte Variante (H ₂ /N ₂ Atmosphäre, Eis)	Aktivitätsverlust binnen 6 h; Aktivitätsverlust binnen 40 min bei Zugabe von NADH		
Stöchiometrische Variante	6 Untereinheiten (HoxFUYH ₂)	4 UE (HoxUYH, 5'-StreptII-HoxF)	6 UE (HoxFUYH, 5'-StreptII-HoxI ₍₂₎)
Eisenatome [Mol/Mol Enzym]	16–19	15–17	15–18
Molekulare Masse (Analytische GF)	nicht bestimmt*	171 kDa	213 kDa
Aerobe spez. Aktivität (gereinigte Variante) ^c	101 U·mg ⁻¹	152 U·mg ⁻¹	173 U·mg ⁻¹
Anaerobe sp. Aktivität (gereinigte Variante) ^c	130 U·mg ⁻¹	192 U·mg ⁻¹	227 U·mg ⁻¹
Aktivierung des ox. Enzyms (NADH)		5 µM NADH	
Aktivierung des ox. Enzyms (NADPH)	40 µM NADPH	nicht möglich	40 µM NADPH
"lag" Phase ohne Aktivator (anaerob) ^d		70–80 s	
"lag" Phase ohne Aktivator (aerob) ^d	135–160 s	150–170 s	140–165 s

^a Die Restaktivität in zellfreien Extrakten wurde alle 30 min (rekombinante Varianten) bzw. alle 120 min (Wildtyp-SH) bestimmt. Nach acht Messpunkten wurde das Zeitintervall vervierfacht.

^b Zur Bestimmung der Stabilität gereinigter Varianten wurden monatlich Aliquots à 50 µL entnommen. Proben wurden nicht mehrfach aufgetaut und eingefroren. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Restaktivität nach 6 Monaten Lagerung unter den angegebenen Bedingungen. Proben wurden unter Luft gelagert.

^c 1 Unit ist definiert als die anaerobe oder aerobe H₂-abhängige Reduktion von 1 µmol NAD⁺ pro Minute. Das Vorgehen ist im Methodenteil (Abschnitt II.4.5.1) beschrieben.

^d Der Begriff „lag-Phase“ beschreibt innerhalb eines photometrischen Assays das Intervall zwischen dem Startpunkt (NAD⁺ Zugabe) und dem Zeitpunkt, bei dem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Der genaue Zusammenhang ist im Diskussionsteil der Arbeit beschrieben (Abschnitt IV.5).

III.4 Untersuchungen zum Reifungsprozess der SH

Eine Einführung in den Reifungsprozess von [NiFe]-Hydrogenasen inklusive der beteiligten Reifungsfaktoren wurde bereits in Abschnitt I.2.2.3.3 gegeben. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte kamen unterschiedliche Techniken zur Untersuchung der Maturation zum Einsatz. Bevor Genomsequenzierungen gängige, automatisierbare Verfahren darstellten, beschränkten

sich diesbezügliche Untersuchungen auf die Identifizierung einzelner Gene mit Relevanz für den H₂-Metabolismus des jeweiligen Organismus [53,159-163,334-336]. Durch „Knockout“-Studien wurden schließlich essentielle Genprodukte für die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen ermittelt, wobei homologe *hyp*-Gene in allen bisher untersuchten [NiFe]-Hydrogenase beherbergenden Organismen gefunden wurden [159,160,162,163,336]. Unter Einsatz biochemischer Methoden erfolgte ab der Jahrtausendwende erstmals die Isolierung und Charakterisierung einzelner Reifungsfaktoren sowie binärer bzw. trinärer Hyp-Komplex-Intermediate. Die bislang wichtigsten Erkenntnisse gingen hierbei aus den Pionierarbeiten von Böck und Mitarbeitern hervor, welche Erkenntnisse zu dem Reifungsprozess der Hydrogenase 3 (HycE Untereinheit) aus *E. coli* lieferten [164,167-172,174-179]. Durch das kombinatorische Potential des in dieser Arbeit präsentierten Klonierungssystems (Abschnitt III.1) wurde erstmals eine umfassende Weiterentwicklung der bisher in diesem Zusammenhang publizierten Techniken ermöglicht (dieses Kapitel und Abschnitte IV.6, 7).

III.4.1 Isolierung reifungsrelevanter Proteine und Komplexe

Die Isolierung einzelner Hyp- bzw. Hox-Proteine durch heterologe Überproduktion und anschließende Reinigung der StrepII-getaggt Genprodukte mittels StrepTactin-Affinitätschromatographie diente der Ermittlung der Löslichkeit, Funktionalität sowie nativer Konformationen derselben. Drei SH-Untereinheiten, HoxF, HoxH und HoxI, wurden als N-terminal StrepII-getaggte Varianten separat produziert. StrepII-HoxF zeigte sich selbst bei Anwendung der für die SH-Produktion optimierten Expressions-Strategie (Abschnitt III.2.2) als weitgehend unlöslich und konnte lediglich als Teil des Diaphorase- oder kompletten SH-Komplexes isoliert werden. StrepII-HoxI war unter gängigen Expressionsbedingungen (IPTG- oder Autoinduktion, 20–30°C) löslich und konnte mit hoher Ausbeute als homogenes Protein gereinigt werden (Abb. III.20f und Tabelle III.12). Eine Reinigung der N-terminal StrepII-getaggt Hydrogenase-Untereinheit HoxH war mithilfe der Affinitätschromatographie möglich, resultierte jedoch in geringerer Ausbeute bei Vergleich mit StrepII-HoxI (Abb. III.20d und Tab. III.12). Dennoch kann dies als essentielle Erkenntnis angesehen werden, da HoxH das primäre Substrat der Reifungsmaschinerie darstellt und somit als einzige Untereinheit auch außerhalb des SH-Komplexes transient vorliegen muss. Im Zuge der zellfreien Maturationsexperimente (ZFM; Abschnitt III.4.4) wurden im späteren Verlauf der Arbeit Hinweise darauf geliefert, dass eine Komplexbildung der HoxFUY(H)-Untereinheiten selbst bei nicht vollständig prozessiertem HoxH-Protein stattfinden kann (Abb. III.33).

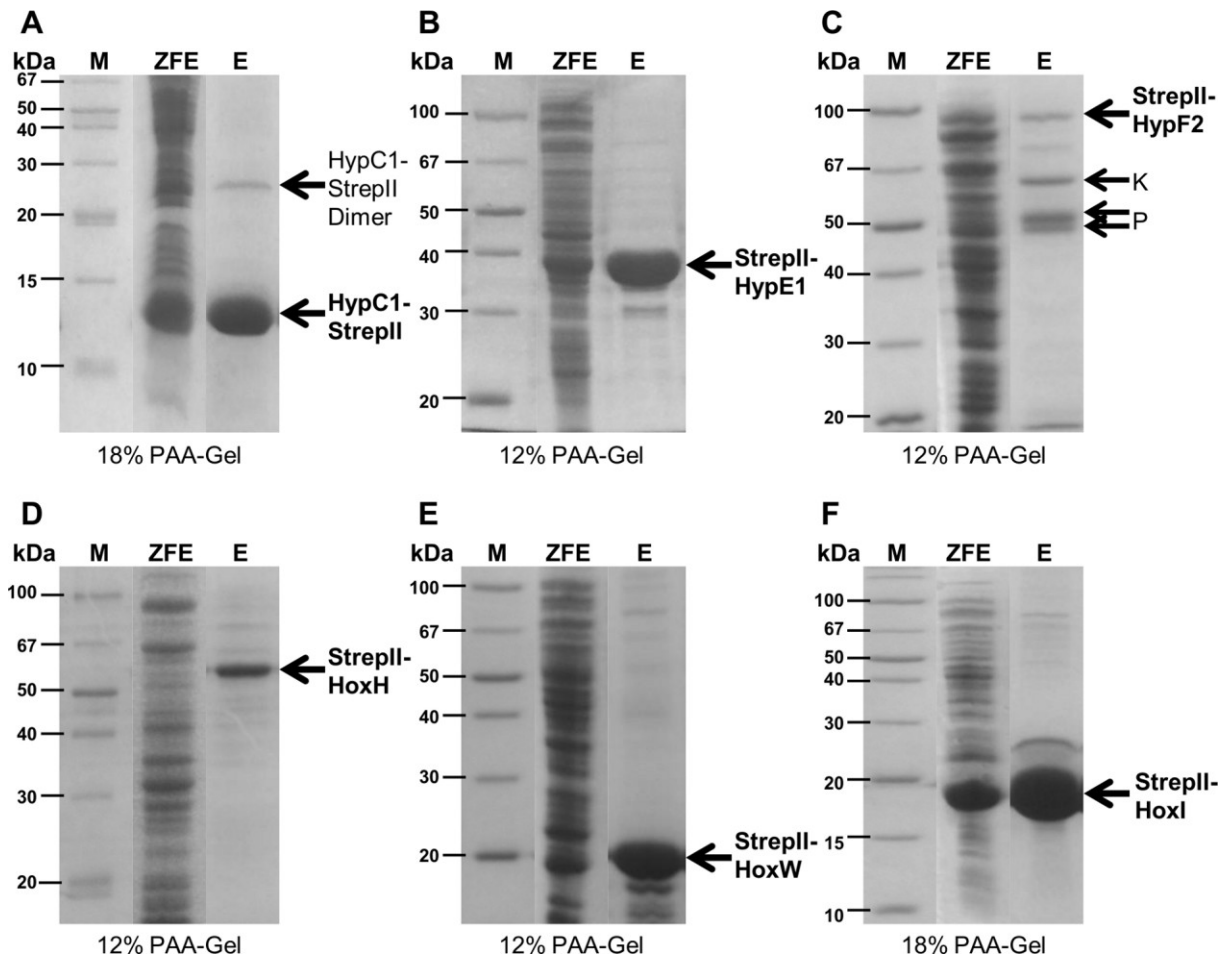


Abb. III.20 – Darstellung des Reinigungserfolgs einer Auswahl einzelner rekombinanter *Cn* Proteine. a) Reinigung von HypC1-StrepII; b) Reinigung von StrepII-HypE1; c) Reinigung von StrepII-HypF2; d) Reinigung von StrepII-HoxH; e) Reinigung von StrepII-HoxW; f) Reinigung von StrepII-HoxI; Proben (25 µg Gesamtprotein bei ZFE; 15 µg bei allen Elutionsfraktionen (E) mit Ausnahme von c) und d), dort je 5 µg; 5 µL Marker) wurden via SDS-PAGE aufgetrennt. Die Bilder wurden teilweise zwischen mehreren Spuren geschnitten, um irrelevante Bereiche zu entfernen. M = Marker; ZFE = Zellfreier Extrakt; E = Gepoolte und konzentrierte Fraktion nach der StrepTactin Affinitäts-Chromatographie; K = Kontaminanten; P = Mögliche Proteolyse-Produkte des Zielproteins. Das HypC1-StrepII Protein (a) bildet ein stabiles Homodimer, welches sich selbst bei SDS-Behandlung nicht vollständig auflöst.

Unter den Reifungsfaktoren wurde lediglich eine Auswahl separat produziert, da in diesem Falle die Koelution der intermediären Hyp-Komplexe direktere Aussagen über die Löslichkeit und Funktionalität erlaubt. C-terminal StrepII-getaggt HypC1 konnte in hohen Ausbeuten isoliert werden, ebenso wie StrepII-HypE1 (Abb. III.20a,b). Ein HypE1-HypF2 Komplex konnte selbst nach zahlreichen Modifikationen der Expressionsbedingungen nicht erfolgreich gereinigt werden. Hierbei war in den Elutionsfraktionen nur jeweils das StrepII-getaggte Protein identifizierbar. Aus diesem Grund wurde StrepII-HypF2 als separates Protein außerhalb des Komplexes produziert und gereinigt. Das vollständige Zielprodukt stellte in diesem Fall nur einen Teil der gereinigten Proteinfraction dar und wurde stets von zwei

dominanten Proteinspezies im Bereich von ca. 45–55 kDa begleitet (Abb. III.20c). Diese erwiesen sich nach Western-Blot Analyse mit Anti-StrepII-Antikörper-Konjugat als verkürzte Varianten von StrepII-HypF2 (Daten nicht gezeigt). Die Proteolyse-Problematik konnte auch durch Einsatz von Protease-Inhibitoren nicht umgangen werden. StrepII-HoxW, die HoxH-spezifische Endopeptidase, konnte in guter Ausbeute nahezu homogen isoliert werden (Abb. III.20e und Tabelle III.12). Die dabei erhaltenen Elutionsfraktionen zeigten eine deutliche rot-braune Färbung. StrepII-HoxW wurde daraufhin einer genaueren Untersuchung unterzogen, welche im späteren Verlauf dieses Abschnitts dokumentiert wird (Abb. III.24a).

Zur Untersuchung von Hyp-Interaktionen und Komplex-Intermediaten hat sich eine Methodik etabliert, bei der eines der Hyp-Proteine mit einem StrepII-Tag fusioniert und anschließend mit den jeweils gebundenen Komplex-Partnern durch Affinitätsreinigung koeluiert wird („*Pulldown*“; [166,180,337]). Anhand der bereits publizierten Ergebnisse konnten mehrere Vorhersagen auch für die *Cn*-Proteine bereits im Vorhinein getroffen werden (Abschnitt I.2.2.3.3). Diese zu erwartenden Komplex-Intermediate konnten in dieser Arbeit – zusätzlich zu mehreren zuvor nie gereinigten oder postulierten Komplexen – erfolgreich isoliert werden (Abb. III.21). C-terminal StrepII-getaggt HypC1 konnte im Komplex mit der Hydrogenase-Untereinheit HoxH (Abb. III.21a) isoliert werden. Dies stellt das erste Intermediat des Reifungszyklus dar (Abb. I.2). Ein HypC1-HypD1 Komplex konnte sowohl mit C-terminal getaggt HypC1 (Abb. III.21b) als auch N-terminal getaggt HypD1 (Abb. III.21c) gereinigt werden. In beiden Fällen war die Produktion des löslichen Komplexes nur bei Anwendung spezieller Kultivierungsbedingungen möglich: Hierbei kam M9-Minimalmedium unter Zusatz von 0,2 mM NH₄Fe(III)-Citrat zum Einsatz und die Kultivierung erfolgte bei 18 °C. HypC1-HypD1-Komplexe zeigten in gereinigter, oxidierter Form eine gelbliche bis braune Färbung. Ebenso wie im Falle von StrepII-HoxW ist eine diesbezügliche genauere Untersuchung innerhalb dieses Kapitels weiter unten beschrieben (Abb. III.24b).

Der trinäre HypC1-HypD1-HypE1 Komplex (Abb. III.21d) konnte erfolgreich aus Stämmen gereinigt werden, in denen das *hypF2* Gen koexprimiert wurde. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen sowohl für die *E. coli* [337] als auch die *Cn* Hyp-Proteine [180], nach denen der Eintritt von HypE1 in den trinären Komplex einer vorherigen Modifikation durch HypF (in diesem Falle: HypF2) bedarf. HypF2 selbst ist nicht Teil des trinären Komplexes (Abb. III.21d). Obwohl ein HypE1-HypF2 Komplex innerhalb dieser Arbeit nicht gereinigt werden konnte (siehe oben), genügt die erfolgreiche Isolierung des HypC1-StrepII/HypD1/HypE1 Komplexes als Hinweis auf die Funktionalität aller vier für die Assemblierung der Eisen-Gruppe benötigten Genprodukte (Abschnitt IV.7).

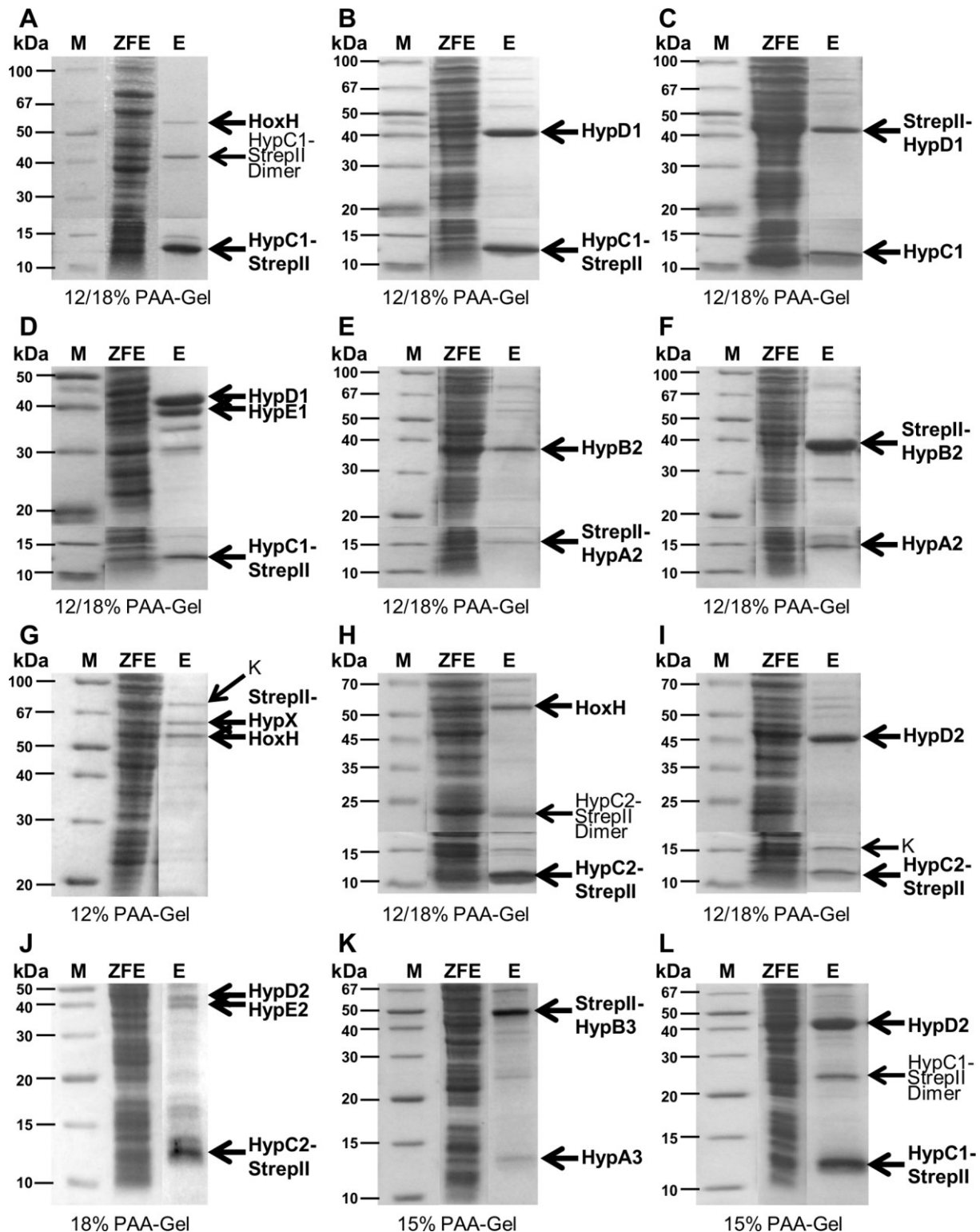


Abb. III.21 – Darstellung einer Auswahl der (partiell) gereinigten *Cn* Hyp-Komplexe. a) HypC1-StrepII//HoxH; b) HypC1-StrepII//HypD1; c) HypC1//StrepII-HypD1; d) HypC1-StrepII//HypD1//HypE1; e) StrepII-HypA2//HypB2; f) HypA2//StrepII-HypB2; g) StrepII-HypX//HoxH; h) HypC2-StrepII//HoxH; i) HypC2-StrepII//HypD2; j) HypC2-StrepII//HypD2//HypE2; k) HypA3//StrepII-HypB3; L) HypC1-StrepII//HypD2; Proben (25 µg Gesamtprotein bei ZFE; 5-10 µg bei gereinigten Fraktionen; 5 µL Marker) wurden via SDS-PAGE aufgetrennt. Die Bilder wurden teilweise zwischen mehreren Spuren geschnitten, um irrelevante Bereiche zu entfernen. M = Marker; ZFE = Zellfreier Extrakt; E = Gepoolte und konzentrierte Fraktion nach der StrepTactin Affinitäts-Chromatographie; K = Kontaminanten; Dimere Formen der HypC1- und HypC2-StrepII-Proteine, welche durch SDS-Behandlung nicht aufgelöst wurden, sind angegeben. Die in d) sichtbaren zusätzlichen Banden entsprechen den mit HypE1 (Abb. III.20b) koeluierten Kontaminanten.

Für die Reinigung des Nickel-Insertionskomplexes HypA2-HypB2 wurde die Fusion des N-terminalen StrepII-Tags sowohl mit HypA2 als auch HypB2 getestet, was in beiden Fällen zur erfolgreichen Koelution des jeweiligen Komplexpartners führte (Abb. III.21e,f). Hierbei ergab die Variante mit StrepII-HypB2 eine deutlich höhere Ausbeute (Tabelle III.12), führte jedoch zu Fraktionen mit deutlich stöchiometrischem Überschuss des getaggtten HypB2 (Abb. III.21f). Heterologe Produktion von HypX, einem bisher nicht charakterisierten Protein, dessen Fehlen in *Cn* Zellen ein Verlust der SH O₂-Toleranz zur Folge hat [202,203], ergab lediglich geringe Mengen löslichen Proteins. Um eine direkte Interaktion von HypX mit HoxH zu untersuchen und im Falle einer Komplexbildung eine höhere Löslichkeit zu erzielen, wurde StrepII-HypX zusammen mit HoxH produziert. Geringe Mengen von StrepII-HypX konnten daraufhin erfolgreich gereinigt werden, wobei HoxH koeluierte (Abb. III.21g). Dies stellt den ersten Hinweis für eine direkte HypX-Interaktion mit der H₂ase-Untereinheit dar.

Zusätzlich zu den M1 Proteinen wurde ein alternativer Satz Hyp-Proteine (HypA3B3C2D2E2F3) innerhalb dieser Arbeit zum ersten Mal untersucht (M2; Abb. III.1 und Tabelle III.3). Hierbei wurde zunächst analog dem zuvor beschriebenen Vorgehen die Möglichkeit der Isolierung von M2-Komplex-Intermediaten untersucht. Die Löslichkeit aller M2-Proteine erwies sich als vergleichsweise gering. Als Einzelproteine konnten HypC2-StrepII, StrepII-HypE2 und StrepII-HypF3 partiell in geringen Ausbeuten gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). StrepII-HypF3 zeigte nach der Affinitätschromatographie noch starke Kontamination. Ein HypE2-HypF3 Komplex konnte, wie auch der analoge HypE1-HypF2 (M1) Komplex, nicht isoliert werden. Der HypC2-StrepII//HypD2 Komplex (Abb. III.21i) wurde hingegen ebenso wie HypA3//StrepII-HypB3 (Abb. III.21k) erfolgreich gereinigt. Nach Modifikation der Expressionsbedingungen (siehe Vorgehen für Produktion von HypC1-HypD1) und unter Koexpression von *hypF3* war schließlich die partielle Reinigung eines trinären HypC2-HypD2-HypE2 Komplex erfolgreich, jedoch in geringer Ausbeute und Reinheit sowie mit sichtbarem Überschuss des StrepII-getaggtten HypC2 (Abb. III.21j).

Als überraschend stellte sich die erfolgreiche Isolierung eines HypC2-StrepII//HoxH Komplexes heraus (Abb. III.21h). Ebenso wie im Falle von HypC1-HoxH (Abb. III.21a) enthielt die Fraktion unterstöchiometrische Mengen von HoxH. Obwohl eine Untersuchung funktionaler Überschneidungen von M1- und M2-Hyp-Proteinen sowie die Fähigkeit zur gegenseitigen Komplementation erst Teil der Abschnitte III.4.2 und III.4.3 ist, konnte eine weitere direkte Wechselwirkung bereits an dieser Stelle nachgewiesen werden: Ein HypC1-StrepII//HypD2 Komplex konnte erfolgreich in hohen Ausbeuten isoliert werden (Abb. III.21l und Tabelle III.12). Die Reinigung weiterer M1-M2-Komplexe erwies sich hingegen

aufgrund der Bildung unlöslicher Aggregate als nicht erfolgreich: HypC2-StrepII//HypD1, StrepII-HypA2//HypB3 und StrepII-HypA3//HypB2 lieferten keinerlei Spuren der Zielproteine in Fraktionen der Affinitätschromatographie.

Tabelle III.12 – Gereinigte rekombinante Reifungs-Proteine und -Komplexe in der Übersicht.

Protein/Komplex	Expressionsvektor ^a	Reinheit ^b	Ausbeute ^c	Native Formen
Einzelproteine				
HypC1-StrepII	pFnT7(3')_hypC1	homogen	5,8 mg·(g Zellen) ⁻¹	mehrere oligomere Formen
StrepII-HypE1	pFcT7(5')_hypE1	homogen	7,3 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf (HypE1) ₃
StrepII-HypF2	pFnT7(5')_hypF2	partiell	0,04 mg·(g Zellen) ⁻¹	Fraktion nicht homogen
StrepII-HoxH	pFcT7(5')_hoxH	nahezu homogen	0,92 mg·(g Zellen) ⁻¹	nicht betrachtet
StrepII-HoxW	pASG(5')_hoxW	nahezu homogen	4,4 mg·(g Zellen) ⁻¹	mehrere oligomere Formen
StrepII-HoxI	pFcT7(5')_hoxI	homogen	17,3 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf (HoxI) ₄
Komplexe				
HypC1-StrepII//HoxH	pE_X(3')_hypC1_X(wt)_hoxH	ÜS HypC1	2 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie
HypC1-StrepII//HypD1	pE_X(3')_hypC1_X(wt)_hypD1	leichter ÜS HypC1	0,19 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie
HypC1//StrepII-HypD1	pE_X(wt)_hypC1_X(5')_hypD1	nahezu homogen	0,15 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie
HypC1-StrepII//HypD1//HypE1	pE_X(3')_hypC1_X(wt)_hypD1/hypF2/hypE1	nahezu homogen	0,61 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1:1 bzw. 2:2:2 Stöchiometrien
HypB2//StrepII-HypA2	pE_X(5')_hypA2_X(wt)_hypB2	partiell	0,13 mg·(g Zellen) ⁻¹	mehrere oligomere Formen
StrepII-HypB2//HypA2	pE_X(wt)_hypA2_X(5')_hypB2	ÜS HypB2	2,3 mg·(g Zellen) ⁻¹	mehrere oligomere Formen
StrepII-HypX//HoxH	pE_X(5')_hypX_X(wt)_hoxH	partiell	0,11 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie
HypC2-StrepII//HoxH	pE_X(3')_hypC2_X(wt)_hoxH	ÜS HypC2	0,57 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie
HypC2-StrepII//HypD2	pE_X(3')_hypC2_X(wt)_hypD2	nahezu homogen	0,12 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie
HypC2-StrepII//HypD2//HypE2	pE_X(3')_hypC2_X(wt)_hypD2/hypE2/hypF3	partiell	0,14 mg·(g Zellen) ⁻¹	Fraktion nicht homogen
StrepII-HypB3//HypA3	pE_X(wt)_hypA3_X(5')_hypB3	partiell	0,11 mg·(g Zellen) ⁻¹	Fraktion nicht homogen
HypC1-StrepII//HypD2	pE_X(3')_hypC1_X(wt)_hypD2	ÜS HypC1	0,16 mg·(g Zellen) ⁻¹	Hinweise auf 1:1 Stöchiometrie

^a Nomenklatur für assemblierte Genkassetten: X(wt) = Pseudo-Wildtyp-Gen unter Kontrolle eines T7-Promoters und –Terminators; X(3') = 3'-StrepII-getaggttes Gen unter Kontrolle eines T7-Promoters und –Terminators; X(5') = 5'-StrepII-getaggttes Gen unter Kontrolle eines T7-Promoters und –Terminators.

^b ÜS = Überschuss; partiell = keine homogene Präparation; Kontaminanten oder Proteolyse-Produkte vorhanden.

^c bezieht sich auf die Gesamtproteinmenge in der gepoolten Elutionsfraktion pro Ausgangs-Zellfeuchtgewicht.

Die exakte stöchiometrische Zusammensetzung eines homo- oder heterogenen Proteinkomplexes kann durch native Gelelektrophorese oder Gelfiltration allein nicht vorbehaltlos bestimmt werden. Dennoch kann durch derartige Techniken eine vorläufige

Übersicht über mögliche native Formen geliefert werden. Eine Auswahl der M1-Proteine und -Komplexe wurde zunächst mittels Nativ-PAGE analysiert (Abb. III.22).

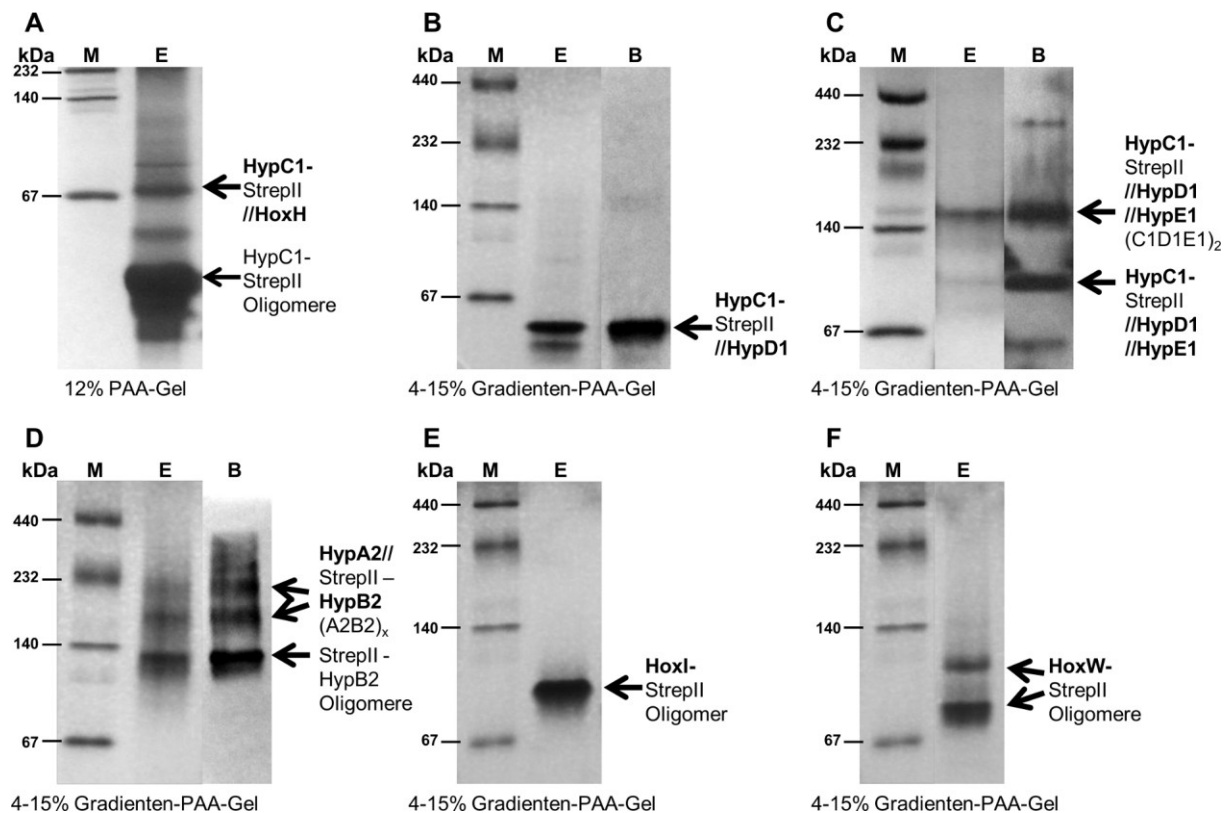


Abb. III.22 – Darstellung einer Auswahl gereinigter rekombinanter Proteine und Komplexe mittels N-PAGE. A) HypC1-StrepII//HoxH; B) HypC1-StrepII//HypD1; C) HypC1-StrepII//HypD1//HypE1; D) HypA2//StrepII-HypB2; E) StrepII-HoxI; F) StrepII-HoxW; Proben (5-10 µg bei gereinigten Fraktionen; 5 µL Marker) wurden via Nativ-PAGE analysiert. Die Bilder wurden teilweise zwischen mehreren Spuren geschnitten, um irrelevante Bereiche zu entfernen. M = Marker; E = Gepoolte und konzentrierte Fraktion nach der StrepTactin Affinitäts-Chromatographie; B = Visualisierung der StrepII-getaggtten Proteine innerhalb der nativen Komplexe mittels Western-Blot und Chemilumineszenz-Detektion; Die Bezeichnungen neben den visualisierten Banden stellen hypothetische Konformationen dar. Die Identität der jeweiligen Spezies wurde auf Basis von Anti-StrepII-Western-Blots, Abgleich mit den Größenstandards des Proteinmarkers und - wo vorhanden - zusätzlich Literaturabgleich analysiert. Die analytische Gelfiltration der HypA2-HypB2 Probe (Abb. III.23b) führte zu einem anderen Größenverteilungsmuster als die Nativ-PAGE (D). Die tatsächlichen molekularen Massen aller Spezies könnten teilweise von dem hier gezeigten Muster abweichen. Proteinstandards: Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Lactat-Dehydrogenase (140 kDa), BSA (67 kDa).

Unter den SH- und M1-Einzelproteinen lieferten HypC1-StrepII (ca. 11 kDa je Monomer), StrepII-HypE1 (ca. 38 kDa je Monomer), StrepII-HypB2 (ca. 36 kDa je Monomer), StrepII-HoxW (ca. 20 kDa je Monomer) und StrepII-HoxI (ca. 20 kDa je Monomer) Hinweise auf oligo- oder multimeren native Formen. Im Falle von HypC1 schienen mehrere stabile Formen möglich, wobei eine prominente Bande im Bereich von ca. 40–50 kDa auf ein Homotetramer hindeutet (Abb. III.22a). Bei den heterodimeren Komplexen HypC1-HoxH und HypC1-HypD1 wurden Hinweise auf stöchiometrische Verhältnisse von 1:1 geliefert (Abb. III.22a,b).

Der trinäre HypC1-HypD1-HypE1 Komplex schien mehrere stabile Formen zu ermöglichen, wobei ein hexamerer $(\text{HypC1})_2\text{-(HypD1)}_2\text{-(HypE1)}_2$ Komplex (ca. 180 kDa) die bevorzugte Konformation darzustellen schien. Dies konnte sowohl mittels Nativ-PAGE (Abb. III.22c) als auch analytischer Gelfiltration (Abb. III.23a) gezeigt werden. Gereinigtes StrepII-HypE1 zeigte bei Analyse mittels Nativ-PAGE eine Bande zwischen 70 und 140 kDa, was auf ein Homotrimer (ca. 110 kDa) hindeutet (unter Vorbehalt, da eine genaue Analyse noch aussteht). Die Analyse des HypA2-HypB2 Komplexes gestaltete sich komplexer, da das HypB2-Einzelprotein mehrere oligomere Formen ermöglicht. N-PAGE Analyse des HypA2//StrepII-HypB2-Komplexes ergab drei dominante Formen (Abb. III.22d). Diese konnten auch bei Analyse der StrepII-HypA2//HypB2 Präparation (siehe Abb. III.21e), in welcher kein HypB2-Überschuss vorlag, beobachtet werden. Die in Abb. III.22d als „StrepII-HypB2 Oligomere“ markierte Bande war in dieser Präparation jedoch geringer ausgeprägt (Daten nicht gezeigt), so dass für das Heterodimer mehrere Konformationen als wahrscheinlich angesehen werden können. Zusätzliche Betrachtung des HypA2-HypB2 Komplexes mittels analytischer Gelfiltration (Abb. III.23b) lieferte wiederum ein abweichendes Muster mit zwei dominanten Formen bei ca. 84 kDa [Mögliche Form: $(\text{HypA2})_1\text{-(HypB2)}_2$] bzw. 143 kDa [Mögliche Form: $(\text{HypA2})_3\text{-(HypB2)}_3$ oder $(\text{HypB2})_4$].

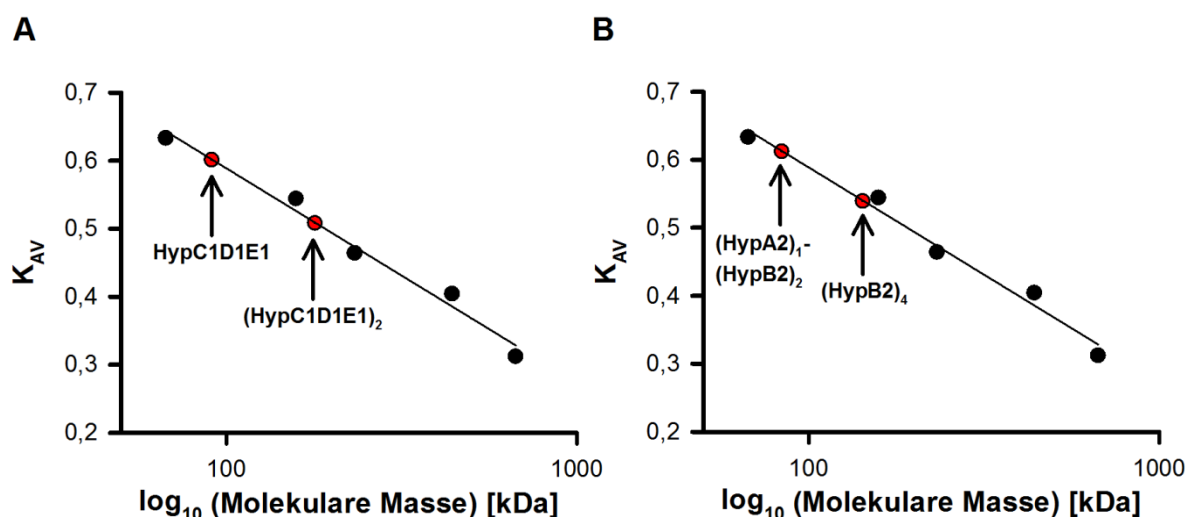


Abb. III.23 – Bestimmung der molekularen Massen gereinigter HypC1D1E1- sowie HypA2B2-Komplexe. Kalibrierstandards und analytische Proben wurden mit einer Superdex 200 HR 10/300 Gelfiltrations-Säule, äquilibriert mit 50 mM KPi Puffer pH 7.0, analysiert. Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa) und BSA (67 kDa) wurden als Standards verwendet. Über den Kalibrationsfit $K_{AV} = -0,137 \cdot \ln(\text{MW}) + 1,2185$ ($R^2 = 0,982$; MW = molekulare Masse; *molecular weight*) wurden für den HypC1D1E1 Komplex (A) native Formen mit molekularen Massen von 91 kDa (HypC1D1E1; $K_{AV} = 0,601$) und 179 kDa [$(\text{HypC1D1E1})_2$; $K_{AV} = 0,508$] ermittelt. Für die HypA2B2 Präparation (B) konnten zwei dominante Spezies mit molekularen Massen von 84 kDa [$(\text{HypA2})_1\text{-(HypB2)}_2$; $K_{AV} = 0,612$] bzw. 143 kDa [$(\text{HypA2})_3\text{-(HypB2)}_3$ oder $(\text{HypB2})_4$; $K_{AV} = 0,539$] identifiziert werden.

Gereinigtes StrepII-HoxI wandert bei Analyse mittels Nativ-PAGE als einzelne Bande, welche auf ein Homotetramer (ca. 80 kDa) hindeutet (Abb. III.22e). Diese Form ist auch stets bei Analyse der hexameren SH_{Var2} zu beobachten, was auf die Ablösung von StrepII-HoxI unter diesen Bedingungen hindeutet (Abb. III.16). Analyse von StrepII-HoxW lieferte keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. III.22f). Aufgrund zweier separater Proteinbanden könnten jedoch auch hier verschiedene oligomere Formen möglich sein.

Mehrere in dieser Arbeit gereinigte rekombinante Proteine oder Proteinkomplexe zeigten charakteristische Färbungen im visuellen Bereich. Präparationen des HypC1-StrepII//HoxH-Komplex erschienen bei einer Konzentration $>50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ grünlich. Da jedoch weder der analoge HypC2-StrepII//HoxH, noch HoxH bzw. HypC1 als einzeln gereinigte Proteine diese Farbgebung aufwiesen, könnte hierbei eine Kontamination für die Einfärbung verantwortlich sein. Alle potentiell eisenhaltigen Proteine und Komplexe zeigten in ihrer oxidierten Form eine gelbliche (verdünnt) bis rötlich-braune Färbung (konzentriert). Hierzu gehörten die SH-Varianten (Abschnitt III.3.3), alle HypD-enthaltenden Komplexe (HypC1-StrepII//HypD1; HypC1//StrepII-HypD1; HypC1-StrepII//HypD1//HypE1; HypC2-StrepII//HypD2; HypC2-StrepII//HypD2//HypE2) sowie überraschend auch StrepII-HoxW. Daraufhin wurden ein HypD1-enthaltender Beispielkomplex (HypC1//StrepII-HypD1) sowie StrepII-HoxW mittels UV/Vis Spektroskopie analysiert, um Hinweisen auf redoxaktive Kofaktoren nachzugehen. Die Ergebnisse sind in Abb. III.24 dargestellt.

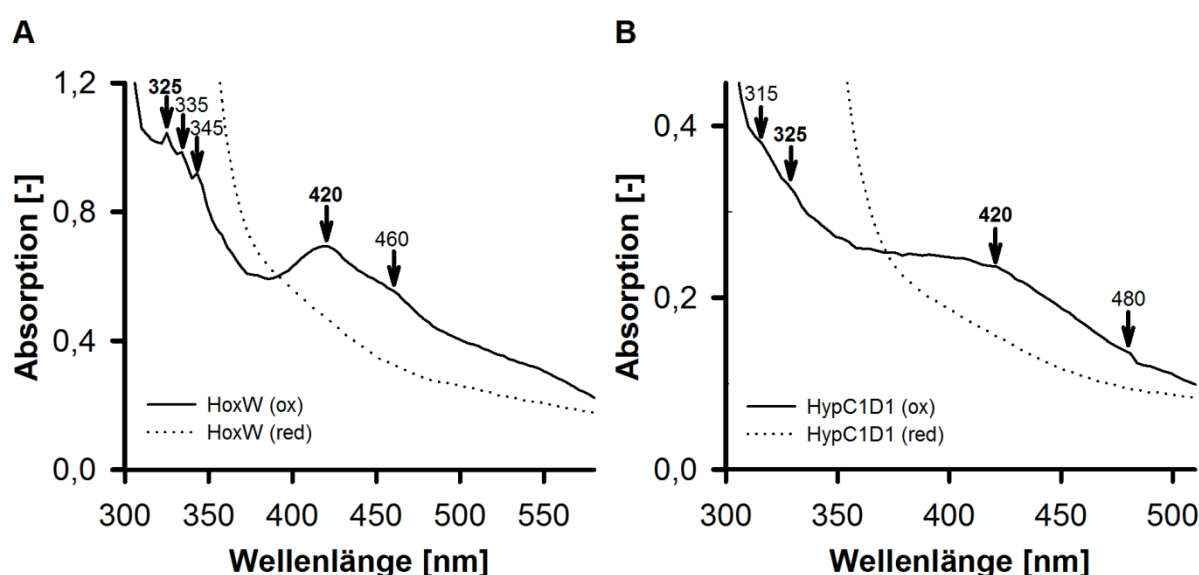


Abb. III.24 – UV/Vis spektroskopische Analyse von gereinigtem StrepII-HoxW und HypC1//StrepII-HypD1. (A) zeigt das Spektrum von gereinigtem oxidierten StrepII-HoxW ($15,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) im Bereich 300–580 nm (durchgehende Linie) sowie das Spektrum derselben Probe nach Reduktion mit 1 mM Dithionit unter anaeroben Bedingungen (gestrichelte Linie). (B) zeigt das Spektrum von gereinigtem oxidierten HypC1//StrepII-HypD1 ($1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) im Bereich 300–510 nm (durchgehende Linie) sowie das Spektrum derselben Probe nach Reduktion mit 200 μM Dithionit unter anaeroben Bedingungen (gestrichelte Linie).

In beiden Fällen sind deutliche Anzeichen für die Präsenz von [4Fe-4S]-Clustern vorhanden, erkennbar durch Absorptionsmaxima im Bereich von 420 bzw. 460–480 nm (Abb. 24a,b) [329-331]. Während für *E. coli* HypD bereits ein solches [4Fe-4S]-Cluster anhand des UV/Vis Spektrums sowie der Präsenz koordinierender Cysteinyl-Reste vorgeschlagen wurde [179], stellt dies den ersten Hinweis für ein solches Strukturmotiv für ein *Cn* Analogon dar. Die weiteren HypD1/D2-enthaltenden Komplexe zeigten entsprechende UV/Vis-Spektren wie in Abb. III.24b anhand des Beispielkomplexes visualisiert (Daten nicht gezeigt).

Gemäß Literatur wurde bislang keine biochemische Charakterisierung von HoxW-Analoga vorgenommen. Da die spektroskopischen Eigenschaften (UV/Vis) wie oben erwähnt stark auf die Präsenz eines redoxaktiven [4Fe-4S]-Clusters hindeuten (Abb. III.24a), wurde zunächst die Aminosäuresequenz auf das Vorhandensein typischer FeS-Koordinationsseiten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Primärsequenz ein Ferredoxin-typisches C_x2C_x2C-Motiv mit einem entfernter liegenden vierten Cysteinyl-Rest aufweist (Abb. III.25) [331,338,339]. Anstelle des Cysteinylrests C₄₉ könnten alternative AS-Reste wie Histidin als vierte Koordinationsstelle fungieren. Durch kolorimetrische Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen wurden $3,9 \pm 0,1$ Mol Eisen pro Mol StrepII-HoxW ermittelt. Eine analytische Betrachtung dieser neuen Erkenntnisse HoxW betreffend ist Teil der Diskussion (Abschnitt IV.8).

MNAPAEFPYVTLADFDDPSTLIYGIGNVGRQDDGLGWAFIDRLEAESLCSGAEVQRHYQLHL
EDADLISRKRKVLFI^DATKDASVASFSLEAEPRMDFSFTS^HHAISIPSIMAT^CQR^CFC^CCLPE
VYVLAIRGYEWELRMGLTPQARHNLDDAIAHFSMRAERQTS

Abb. III.25 – Aminosäuresequenz von HoxW mit essentiellen und den neu identifizierten Motiven. Die grün hervorgehobenen Aminosäurereste bilden das essentielle Motiv für die Nickel-Erkennungsseite, welche konserviert in allen Hydrogenase-spezifischen Endopeptidasen (Gruppe: NAD⁺-reduzierende bidirektionale H₂asen ← HoxW-Familie) vorliegen. Das in dieser Arbeit vorgeschlagene FeS-Cluster Koordinations-Motiv (C₄₉, C₁₁₅, C₁₁₈, C₁₂₁) wurde gelb hervorgehoben. Hierbei sei angemerkt, dass weitere Aminosäure-Reste neben C₄₉ als potentielle vierte Koordinationsstelle fungieren könnten. Eine detaillierte Betrachtung mit Sequenz-Alignments liegt innerhalb des Diskussionsteils dieser Arbeit vor (Abschnitt IV.8).

III.4.2 *In-vivo*-Deletionsexperimente zur Untersuchung der SH-Reifung

Die Untersuchung der Relevanz bzw. Essentialität putativer Maturasen wird konventionell durch „Knockout“-Studien durchgeführt. Im Falle von *Cupriavidus necator* sind zahlreiche Untersuchungen des H₂-Metabolismus im Allgemeinen und der energieliefernden Hydrogenasen auf biochemischer und strukturanalytischer Ebene dokumentiert. Der Reifungsprozess der Enzyme und die hierbei relevanten Gene standen hierbei jedoch lediglich vereinzelt im Fokus [161-163,180,182,185,186,196,198,199,202,226,283,340-342]. Die

Zerlegung der Reifungsprozesse in *Cn* gestaltet sich als aufwendig, da innerhalb des Genoms mehrere Kopien der *hyp*-Gene vorliegen ([236] und Abb. III.1). Die Fähigkeit der innerhalb des MBH- und SH-Clusters vorliegenden *hyp*-Gene zur gegenseitigen Komplementation wurde sowohl für die SH- als auch für die MBH-Reifung demonstriert [316]. Eine genaue Analyse des Einflusses jedes binären Komplexes (Abschnitt III.4.1) auf die Reifungseffizienz wurde bisher nicht vorgenommen. Ebenso ungeklärt blieb bisher die Rolle des *hyd4* Clusters (M2-Gene). In dieser Arbeit wurden daher rekombinante Stämme generiert, welche Deletions- und Komplementationsstudien (bezogen auf die SH) innerhalb des heterologen Systems in einfacher und präziser Weise ermöglichen sollten. Hierzu kam die neu entwickelte Klonierungstechnik zum Einsatz.

Für die Deletions-Experimente in dieser Arbeit sollte der Einfluss des Fehlens binärer Hyp-Komplexe (HypA2B2, HypC1D1 und HypE1F2 für das M1-Modul; HypA3B3, HypC2D2 und HypE2F3 für das M2-Modul; HypX und HoxW für beide Module) auf die finale ZFE-Aktivität, und damit den Reifungserfolg der SH, untersucht werden. Die hierfür konstruierten Expressionsplasmide können als Derivate der pM1- und pM2-Konstrukte angesehen werden (Abb. III.26; Basisvektor: pSm.CDF.3a). Die Deletionsstämme wurden durch Transformation des Stammes K0 (*E. coli* BL21Star™ mit pSH4.wt; Tabelle III.13) mit den in Abb. III.26 dargestellten jeweiligen Konstrukten erzeugt. Unter Anwendung des in Abschnitt II.2.1.2.2 beschriebenen „Standardverfahrens“ wurden daraufhin alle Stämme mittels Autoinduktion getestet. Über die in den löslichen Zellextrakten messbare SH-Aktivität konnten anschließend Rückschlüsse über den Reifungserfolg abgeleitet werden (Abb. III.27a,b und Tabelle III.13).

Die Basisstämme K1A (*E. coli* BL21Star™; pSH4.wt + pM1) und K1B (pSH4.wt + pM2) lieferten Extrakt-Aktivitäten von $1,95 \pm 0,24 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bzw. $0,15 \pm 0,02 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Tabelle III.13). Zum Zeitpunkt der Deletions-Experimente war die in Abschnitt III.2.2 beschriebene Optimierung hinsichtlich der Vorkultur noch nicht entwickelt, weswegen die spezifischen Aktivitäten folglich hinter den maximal erreichten Werten zurückblieben (Tabelle III.6; K1A). Da die M2-Stämme zwar die partielle Synthese funktionaler SH erlaubten, die Aktivität von K1B jedoch eine Größenordnung unter der von K1A lag, wurden die Werte der M1- und M2-Experimente separat ausgewertet und normalisiert.

Die Deletionen von HypC1D1 sowie HypE1F2 führten jeweils zum nahezu vollständigen Verlust der SH-Aktivität (1–2% der K1A-Aktivität; Abb. III.27a und Tabelle III.12). Im Falle des Nickel-Insertionskomplexes HypA2B2 wurde die SH-Aktivität auf ca. 10% des K1A-Wertes reduziert (Tabelle III.13), konnte jedoch durch Zugabe von $25 \text{ } \mu\text{M}$ NiCl_2 zum Medium partiell komplementiert werden (Abb. III.12). Die maximal erreichte spezifische

Extrakt-Aktivität konnte in dieser Weise auf $0,42 \pm 0,05 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (ca. 21% von K1A) gesteigert werden. Höhere Nickel-Konzentrationen im Medium verringerten allerdings die spezifische Aktivität (Abb. III.12). Im Falle der bisher nicht charakterisierten Maturase HypX konnte bei Entfernung des Gens (*hypX*) ein vergleichsweise geringer Effekt auf die anaerobe SH-Aktivität beobachtet werden ($1,5 \pm 0,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; ca. 77% der K1A-Aktivität; Abb. III.27a und Tabelle III.13). Im Gegensatz zur Entfernung der anderen M1-Proteine verlor die rekombinante SH dieses Stammes jedoch die Eigenschaft der O_2 -Toleranz und war instabil außerhalb der Extrakt-Umgebung (Anhang, Tabelle VI.4). Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie [202] und bekräftigt die Rolle von HypX als eine für die Aneignung der SH- O_2 -Toleranz essentielle Maturase. Das Fehlen der HoxH-spezifischen Endopeptidase HoxW führte, ebenso wie das Fehlen des kompletten Reifungsmoduls M1 (Stamm K0), zu vollständigem Aktivitätsverlust (Abb. III.27a).

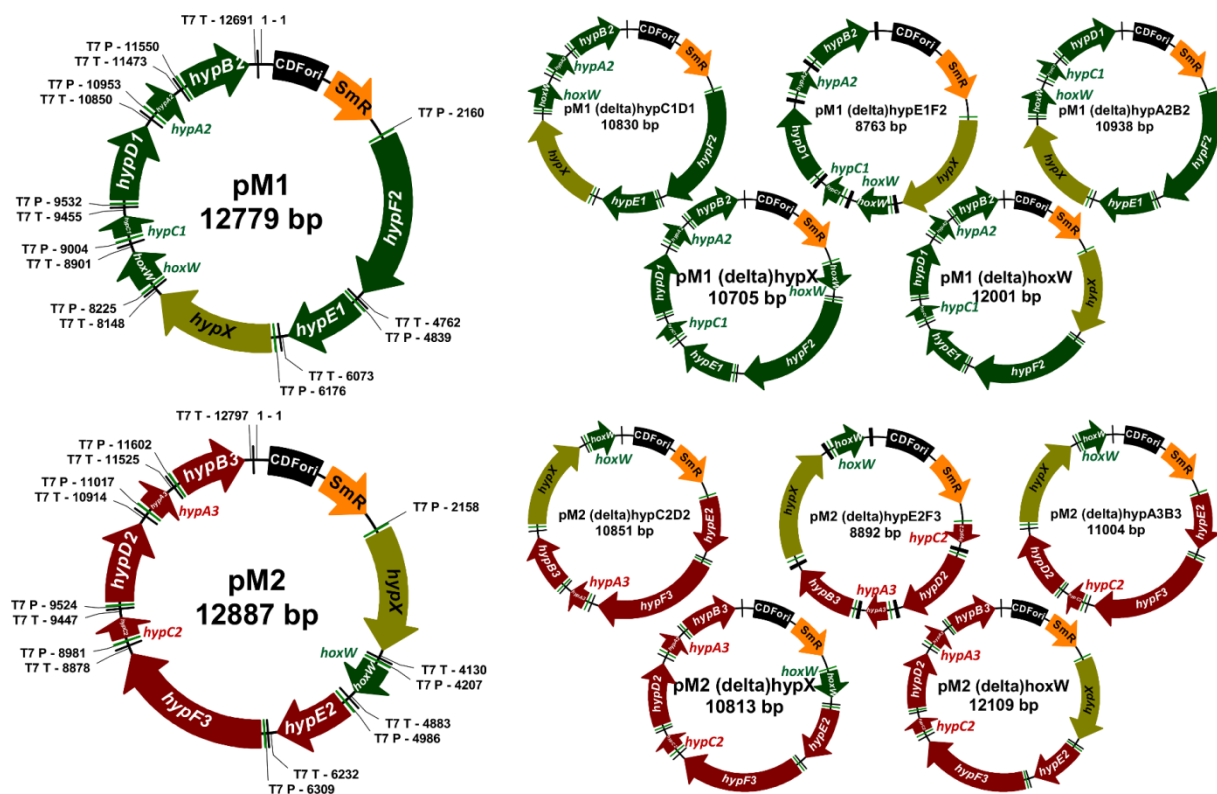


Abb. III.26 – Vektorkarten der M1- und M2-Deletionsplasmide sowie der Basiskonstrukte pM1 & pM2. Alle Gene innerhalb der hier gezeigten Konstrukte standen unter Kontrolle individueller T7-Promotoren (T7 P, grüne Regulationselemente) und –Terminatoren (T7 T, schwarze Regulationselemente). SmR = Spectinomycin-Resistenzgen; CDF ori = CloDF1 Replikationsursprung. Die hier gezeigten Konstrukte waren kompatibel mit pSH-Konstrukten (Kanamycin Resistenzgen, ColE1 Replikationsursprung) und wurden innerhalb der Deletionsstämme mit pSH4.wt (Wildtyp-*hoxF*, *hoxU*, *hoxY*, *hoxH* unter T7P/T Kontrolle) kombiniert. Die Farbgebung der *Cn* Gene entspricht der in Abb. III.1 eingeführten Einteilung. Entfernte Gene sind anhand der jeweiligen Plasmidbezeichnung ersichtlich: (delta)*Gen1Gen2*.

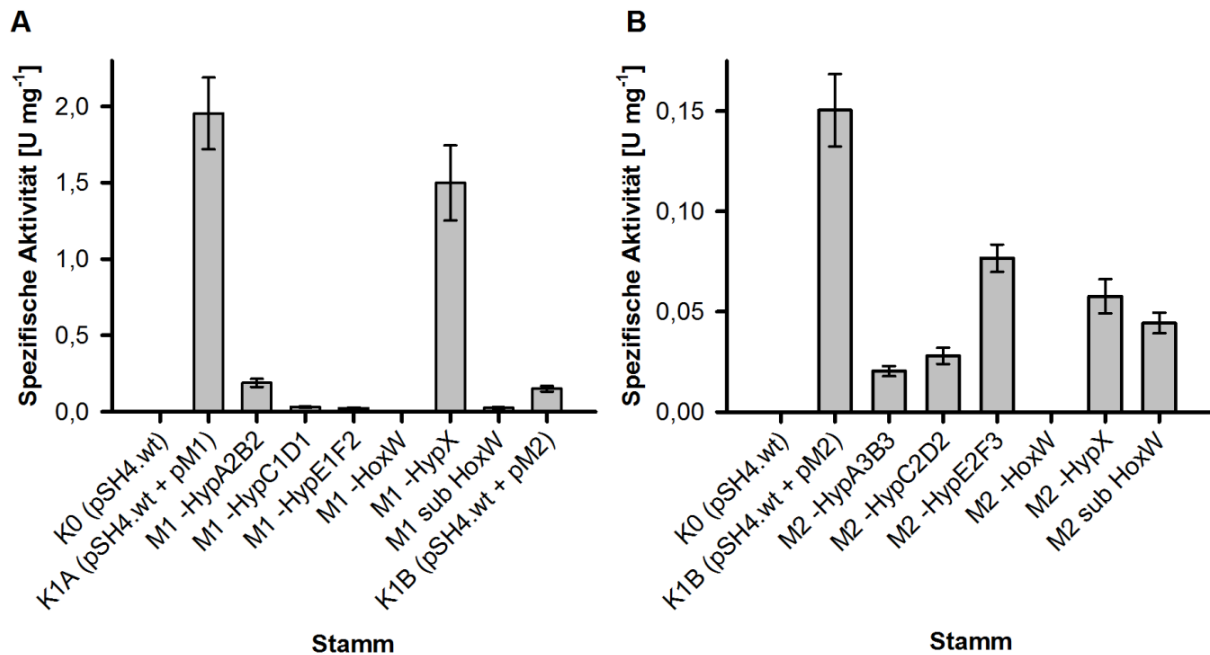


Abb. III.27 – Ergebnisse der *in-vivo*-Deletions-Experimente für die Reifungssätze M1 und M2. Die dargestellten Aktivitäten entsprechen den anaeroben SH-Aktivitäten in löslichen Zellextrakten der jeweiligen Expressionsstämme für den M1- (A) bzw. M2-Reifungssatz (B). Entsprechende Stammbezeichnungen sind in Tabelle III.13 gelistet, wobei das hierbei dargestellte „Minus“ Zeichen einem „ Δ “ entspricht. Zur statistischen Analyse wurden die Aktivitäten dreier unabhängiger Experimente ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen den in Tabelle III.13 angegebenen Standardabweichungen. Die maximal erreichten Aktivitäten für die beiden Reifungssätze lagen bei $1,95 \pm 0,24 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (K1A) bzw. $0,15 \pm 0,02 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (K1B; ca. 8% der K1A-Aktivität).

Die mithilfe des M2-Reifungssatzes erreichte SH-Aktivität lag bei ca. 8% des K1A-Wertes (Tabelle III.13). Die analogen Deletions-Experimente für den M2-Satz lieferten darüber hinaus Anhaltspunkte für die Funktionalität aller M2-Hyp-Proteine, da Entfernungen der binären Komplexe auch hier Verminderungen der SH-Aktivität zur Folge hatten (Abb. III.27b). Unter den M2-Proteinen zeigte die Deletion des HypA3B3 Komplexes *in vivo* den größten Effekt (ca. 14% Restaktivität verglichen mit K1B, Tabelle III.13).

Ebenso wie bei HypA2B2 konnte dieser Effekt durch Nickel-Supplementation teilweise komplementiert werden. Zugabe von $100 \mu\text{M NiCl}_2$ zum Medium ergab für K1B $\Delta\text{HypA3B3}$ spezifische Extraktaktivitäten von bis zu $0,11 \pm 0,01 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (ca. 73% der K1B-Aktivität). HypC2D2-Entfernung reduzierte die SH-Aktivität auf ca. 19% der K1B-Aktivität (Abb. III.27b und Tabelle III.13). Überraschend gering fiel hingegen der HypE2F3-Deletionseffekt aus (Restaktivität ca. 50% von K1B). Im Falle von HypX ergab sich wie bei M1 der sekundäre Effekt eines Verlustes der SH- O_2 -Toleranz. Darüber hinaus fiel die Extraktaktivität des Stammes auf ca. 40% des K1B-Wertes ab (Abb. III.27b). HoxW-Entfernung führte, wie im Falle des M1-Satzes beobachtet, zu vollständigem Verlust der SH-Aktivität (Abb. III.27a,b und Tabelle III.13).

Tabelle III.13 – Liste der M1- und M2-*in-vivo*-Deletions- und Substitutionsstämme inklusive Aktivitäten.

Kategorie	Stammbezeichnung	Spezifische Aktivität [U·mg ⁻¹] ^a	Normalisierte Aktivität
Kontrollstämme	<i>E. coli</i> BL21Star(DE3)	< 0,001	
	K0 [pSH4.wt; ΔM1/M2]	< 0,001	
M1 Deletions-Stämme (Plasmide siehe Abb. III.26)	K1A [pSH4.wt + pM1]	1,95 ± 0,24	100%
	K1A ΔHypA2B2	0,19 ± 0,03	9,6%
	K1A ΔHypC1D1	0,03 ± 0,003	1,6%
	K1A ΔHypE1F2	0,024 ± 0,004	1,2%
	K1A ΔHoxW	< 0,001	0%
	K1A ΔHypX	1,5 ± 0,25	77%
M2 Deletions-Stämme (Plasmide siehe Abb. III.26)	K1B [pSH4.wt + pM2]	0,15 ± 0,02	100% (7,7%) ^b
	K1B ΔHypA3B3	0,020 ± 0,003	14% (1%) ^b
	K1B ΔHypC2D2	0,028 ± 0,004	19% (1,4%) ^b
	K1B ΔHypE2F3	0,077 ± 0,007	51% (3,9%) ^b
	K1B ΔHoxW	< 0,001	0%
	K1B ΔHypX	0,058 ± 0,009	38% (3%) ^b
M1 Substitutions-Stämme (Plasmide siehe Abb. III.28)	K1A-HypA3B3 ΔHypA2B2	1,21 ± 0,1	62% ^b
	K1A-HypC2D2 ΔHypC1D1	0,059 ± 0,006	3,0% ^b
	K1A-HypE2F3 ΔHypE1F2	0,038 ± 0,004	1,9% ^b
	K1A-PHG070 ΔHoxW	0,025 ± 0,004	1,3% ^b
M2 Substitutions-Stämme (Plasmide siehe Abb. III.28)	K1B-HypA2B2 ΔHypA3B3	0,18 ± 0,02	8,9% ^b (116%) ^c
	K1B-HypC1D1 ΔHypC2D2	0,024 ± 0,003	1,2% ^b (16%) ^c
	K1B-HypE1F2 ΔHypE2F3	0,76 ± 0,14	39% ^b (502%) ^c
	K1B-PHG070 ΔHoxW	0,044 ± 0,005	2,3% ^b (29%) ^c

^a 1 Unit (U) entspricht 1 μmol aus H₂-generiertem NADH pro Minute. Assays wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Aktivitäten wurden in zellfreien Extrakten, welche aus Zellen dreier unabhängiger Kultivierungsexperimente des jeweiligen Stammes hergestellt wurden, ermittelt. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente sowie die sich daraus ergebenden Standardabweichungen (±) sind gezeigt. Alle Kultivierungen wurden bei RT für 40 h (Schikanekolben; 100 mL; 200 UpM) in M9-Medium (0,1% w/v Glucose; 2% v/v Glycerin; 0,8% w/v Laktose; Supplemente: siehe Abb. III.11) vorgenommen.

^b Normalisierung bezieht sich auf Stamm K1A (1,95 ± 0,24 U·mg⁻¹ = 100%).

^c Normalisierung bezieht sich auf Stamm K1B (0,15 ± 0,02 U·mg⁻¹ = 100%).

III.4.3 *In-vivo*-Substitutionsexperimente zur Untersuchung der SH-Reifung

Die in den Abschnitten III.4.1 und III.4.2 vorgestellten Untersuchungen zeigten hinsichtlich der vor dieser Arbeit nahezu unbekannten *hyd4* (M2) Genprodukte, dass diese i) funktional aktiv sind (III.4.1 und III.4.2); ii) zu variablen Anteilen innerhalb des heterologen Systems in ihrer löslichen Form produziert werden können (III.4.1); iii) ebenfalls die für den M1-Satz erwarteten Hyp-Komplexbildungen zeigen (III.4.1) und iv) zur partiellen Komplementation der M1 Hyp-Proteine im Zuge der SH-Reifung befähigt sind (III.4.1, HypC2-StrepII//HoxH-Komplex und III.4.2). Im nächsten Schritt sollte nun der direkte Austausch jeweils eines

binären Hyp-Komplexes durch den analogen Komplex des zweiten Reifungssatzes untersucht werden. Mithilfe der daraus erhaltenen Resultate sollten Aussagen über die Fähigkeit der analogen Hyp-Paare zur gegenseitigen Komplementation gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden wie in Abschnitt III.4.2 entsprechende Module designt, welche auch in diesem Fall als Derivate der pM1- und pM2-Konstrukte angesehen werden können (Abb. III.28; Basisvektor: pSm.CDF.3a). Mit Ausnahme von *hypX*, zu welchem kein analoges Gen innerhalb des *hyd4* Clusters existiert, entsprachen alle zu diesem Zweck hergestellten Plasmide den Deletionsplasmiden mit dem Unterschied, dass das/die fehlende(n) Gen(e) aus dem jeweils alternativen Reifungssatz hinzugefügt wurde(n) (Abb. III.28 und Tabelle III.13).

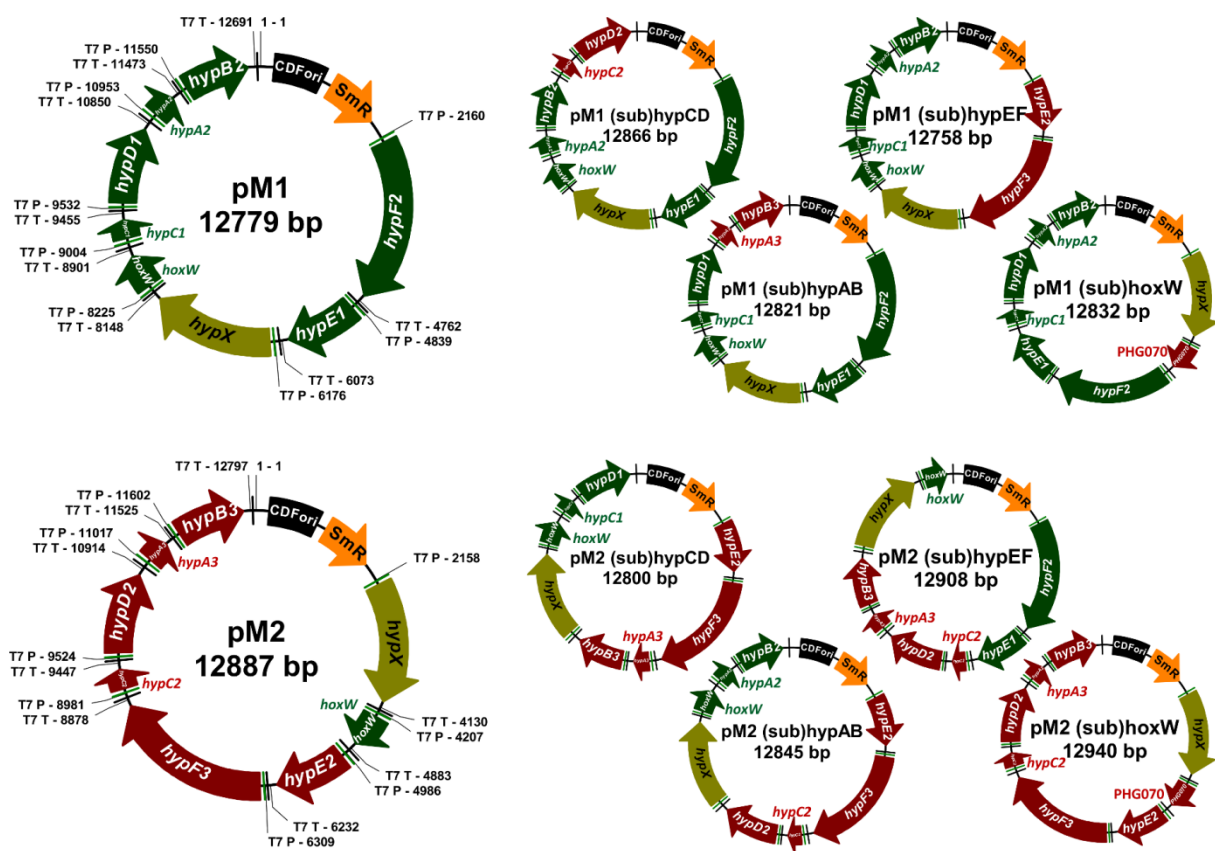


Abb. III.28 – Vektorkarten der M1- und M2-Substitutionsplasmide sowie der Basiskonstrukte pM1 & pM2. Alle Gene innerhalb der hier gezeigten Konstrukte standen unter Kontrolle individueller T7-Promotoren (T7 P, grüne Regulationselemente) und –Terminatoren (T7 T, schwarze Regulationselemente). SmR = Spectinomycin-Resistenzgen; CDF ori = CloDF1 Replikationsursprung. Die hier gezeigten Konstrukte waren kompatibel mit pSH-Konstrukten (Kanamycin Resistenzgen, ColE1 Replikationsursprung) und wurden innerhalb der Deletionsstämme mit pSH4.wt (Wildtyp-*hoxF*, *hoxU*, *hoxY*, *hoxH* unter T7P/T Kontrolle) kombiniert. Die Farbgebung der *Cn* Gene entspricht der in Abb. III.1 eingeführten Einteilung. Substituierte Gene sind innerhalb der jeweiligen Plasmidbezeichnung kenntlich gemacht: (sub)*hypXY* wurde jeweils durch das analoge Genpaar ausgetauscht (Tabelle III.13). Die (sub)*hoxW*-Konstrukte enthalten das PHG070-Gen anstelle von *hoxW*.

Zur Ermittlung der Stammaktivitäten wurde das in Abschnitt III.4.2 beschriebene Vorgehen adaptiert. Auch hier wurden die Basisstämme K1A (*E. coli* BL21Star™; pSH4.wt + pM1) und K1B (pSH4.wt + pM2) mit den ermittelten Extrakt-Aktivitäten von $1,95 \pm 0,24 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bzw. $0,15 \pm 0,02 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ zur Normalisierung herangezogen (Tabelle III.13). Innerhalb der M1-Experimente erlaubte lediglich die Substitution des HypA2B2-Komplexes durch das M2-Analogon eine partielle Komplementation. Verglichen mit dem HypA2B2-Deletionsstamm (ca. 10% Restaktivität von K1A; Tabelle III.13) konnte hierbei eine Wiederherstellung von 62% der K1A-Aktivität demonstriert werden (Abb. III.29a und Tabelle III.13). Substitution der Komplexe HypC1D1 und HypE1F2 durch die M2-Analoga hingegen resultierte in lediglich leichten Erhöhungen der Aktivität verglichen mit den Deletionsstämmen, wobei die dadurch erzielten Aktivitäten unter 5% der K1A-Werte verblieben (Abb. III.29a und Tabelle III.13). Ein überraschender Effekt wurde hingegen bei Substitution von HoxW durch das *hyd4*-analoge PHG070-Genprodukt beobachtet. Obwohl sich HoxW innerhalb der Deletionsexperimente (Abschnitt III.4.2) als essentiell herausstellte, konnten ca. 1–2% der K1A-Aktivität durch Substitution mit PHG070 wiederhergestellt werden (Abb. III.29a und Tabelle III.13). Dies stellt die erste Demonstration der funktionalen Komplementation einer spezifischen Reifungsprotease dar.

Im Falle der M2-Substitutionsstämmen konnten bei Vergleich mit korrespondierenden M2-Deletionsstämmen deutliche Effekte auf die resultierende SH-Aktivität beobachtet werden. Die bereits für K1A-HypA3B3 Δ HypA2B2 demonstrierte Kompatibilität der beiden HypAB-Komplexe konnte auch für den umgekehrten Austausch (M2-Satz) bestätigt werden (Abb. III.29b): Austausch von HypA3B3 durch HypA2B2 führte zur vollständigen Herstellung der mit K1B erreichten Aktivität ($0,18 \pm 0,02 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$; entspricht dem 1,2fachen Wert der K1B-Aktivität). Ein noch deutlicherer Effekt wurde bei Substitution des M2-HypE2F3-Komplexes durch den M1-HypE1F2-Komplex erzielt. Dieser Austausch führte zu einem Anstieg der Aktivität auf den mehr als fünffachen Wert von K1B, was ca. 40% der K1A-Aktivität entspricht (Abb. III.29b und Tabelle III.13). Im Gegensatz dazu konnte der Effekt der HypC2D2-Deletion nicht durch Austausch mit dem analogen HypC1D1 kompensiert werden (Abb. III.29b). Der für M1 beobachtete Effekt bei Austausch von HoxW durch PHG070 bestätigte sich auch für den M2-Satz. Im Vergleich zum diesbezüglichen M1-Substitutionsstamm lag die erzielte Aktivität in diesem Falle sogar minimal höher (Abb. III.29a,b und Tabelle III.13).

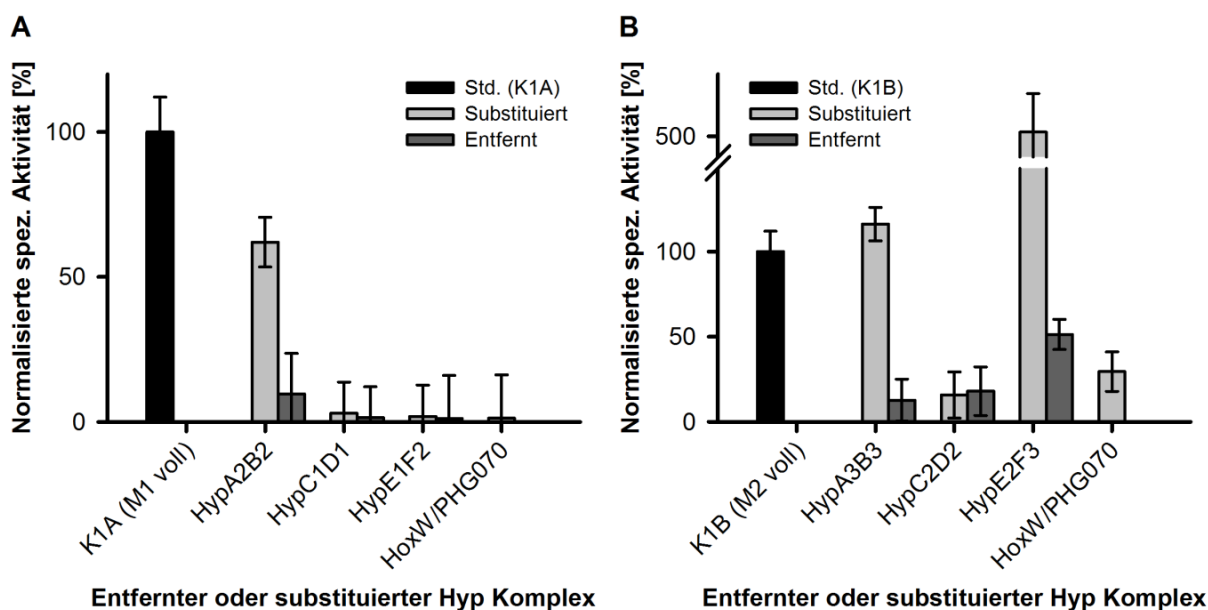


Abb. III.29 – Gegenüberstellung der Ergebnisse von *in-vivo*-Deletions- und Substitutions-Experimenten. Die dargestellten Aktivitäten entsprechen den anaeroben SH-Aktivitäten in löslichen Zellextrakten der jeweiligen Expressionsstämme für den M1- (A) bzw. M2-Reifungssatz (B). Entsprechende Stammbezeichnungen sind in Tabelle III.13 gelistet. Zur statistischen Analyse wurden die Aktivitäten dreier unabhängiger Experimente ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen den in Tabelle III.13 angegebenen und auf die prozentualen Normalisierungen umgerechneten Standardabweichungen. Vergleiche: **K1A** = Basis-Stamm M1 (pSH4.wt + pM1); **HypA2B2** = K1A-HypA3B3 Δ HypA2B2 (Substitutions-Stamm; Farbgebung siehe Legende) vs. K1A Δ HypA2B2 (Deletions-Stamm; Farbgebung siehe Legende); **HypC1D1** = K1A-HypC2D2 Δ HypC1D1 vs. K1A Δ HypC1D1; **HypE1F2** = K1A-HypE2F3 Δ HypE1F2 vs. K1A Δ HypE1F2; **HoxW/PHG070 (A)** = K1A-PHG070 Δ HoxW vs. K1A Δ HoxW; **K1B** = Basis-Stamm M2 (pSH4.wt + pM2); **HypA3B3** = K1A-HypA2B2 Δ HypA3B3 vs. K1A Δ HypA3B3; **HypC2D2** = K1A-HypC1D1 Δ HypC2D2 vs. K1A Δ HypC2D2; **HypE2F3** = K1A-HypE1F2 Δ HypE2F3 vs. K1A Δ HypE2F3; **HoxW/PHG070 (B)** = K1B-PHG070 Δ HoxW vs. K1B Δ HoxW.

III.4.4 Entwicklung eines zellfreien *in-vitro*-Reifungssystems für die SH

Innerhalb dieses Kapitels (III.4) konnte bislang gezeigt werden, dass sich das heterologe *in-vivo*-Expressionssystem eignet, um Experimente zur Aufklärung des komplexen Reifungsprozesses einer [NiFe]-Hydrogenase zu designen und umzusetzen. Gleichzeitig sind *in-vivo*-Systeme gewissen Beschränkungen unterworfen, da die Bedingungen innerhalb einer lebenden Zelle schwer simulierbar bzw. direkt manipulierbar sind. Auf das *in-vitro*-System übertragene Prozesse eröffnen darüber hinaus Möglichkeiten, „Pulldown-Assays“ zur Isolierung ansonsten schwer erfassbarer Intermediate durchzuführen. Im Falle der Assemblierung von [FeFe]-Hydrogenasen, an welcher drei Hilfsproteine beteiligt sind (Abschnitt I.2.2.2), wurde der Großteil der bisherigen Erkenntnisse unter Einsatz von *in-vitro*-Systemen gewonnen [81,82,343-345]. Im Gegensatz dazu existiert bislang lediglich ein Bericht über die erfolgreiche *in-vitro*-Reifung einer [NiFe]-Hydrogenase, der Hydrogenase 2 aus *E. coli* [346]. Dies lässt sich mit der höheren Komplexität des Prozesses und der größeren

Anzahl beteiligter Hilfsproteine bei Reifung dieser Enzyme erklären. Um ein reproduzierbares zellfreies *in-vitro*-Maturationssystem (ZFM) für die SH zu entwickeln, wurden die Erkenntnisse aus den Kapiteln III.4.1–4.3 gebündelt, optimale Parameter für das System bestimmt und die Möglichkeiten einer solchen Plattform anhand der Ausweitung der in III.4.2 und III.4.3 vorgestellten Reifungsexperimente auf die zellfreie Umgebung demonstriert.

Die Basis des zellfreien Systems wurde durch Kombination von Zellextrakten unter Pufferung und Zusatz essentieller Komponenten (ATP, DTT, FMN, Eisen, Nickel und Carbamoylphosphat) gebildet. Die Methodik ist ausführlich in Abschnitt II.4.6 beschrieben. Tabelle III.14 liefert eine Übersicht über die für nachfolgend vorgestellte Experimente (Abb. III.30–33) eingesetzten Extrakte. Zur Vergleichbarkeit wurden in allen Experimenten Basis-Assays mitgeführt, welche stets einheitliche Extraktanteile beinhalteten. Diese Basis-Ansätze enthielten die in Tabelle II.7 angegebenen „Standard-Endkonzentrationen“ der Komponenten sowie entweder je 15% (v/v) des SH- und des M1- oder M2-Gesamtextrakts oder alternativ 15% (v/v) des SH- und je 7,5% (v/v) jedes M1- oder M2-Einzelextrakts. Die auf diese Weise erhaltenen SH-Aktivitäten bei Assay-Stopp schwankten leicht in Abhängigkeit des als Ausgangsmaterial eingesetzten Zell-Batches, lagen jedoch stets bei 3–3,9 U·mL⁻¹ (M1-Gesamt), 3,4–4,0 U·mL⁻¹ (kombinierte M1-Einzelextrakte), 1,3–1,6 U·mL⁻¹ (M2-Gesamt) bzw. 1,2–1,4 U·mL⁻¹ (kombinierte M2-Einzelextrakte). Damit lag die Reifungseffizienz des M2-Satzes *in vitro* mit 30–55% von M1 erheblich über der zuvor im *in-vivo*-System beobachteten (ca. 8% von M1; Abb. III.27a & Tabelle III.13). Beide Maturationssätze zeigten maximale Aktivitäten in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8,0. Bei Verwendung von Phosphat- oder MOPS-Puffer (pH 7,0) für Extraktherstellung und Assay lagen die erreichten Aktivitäten sowohl für M1 als auch M2 bei ca. 60–80% der maximalen Werte (Daten nicht gezeigt).

ATP, DTT, FMN, FeSO₄, NiCl₂ und Carbamoylphosphat (CMP) wurden den Assays in den zuvor empirisch ermittelten Konzentrationsbereichen (Tabelle II.7) zugefügt. Entfernung aller oder je einer der Komponenten zeigte die in Abb. III.30a dargestellten Effekte. Da HypB-Proteinen eine GTPase-Aktivität im Zuge der Nickel-Insertionsreaktion zugesprochen wird [190,191,193,194,347–349], wurde GTP als zusätzliche Assay-Komponente getestet, erwies sich jedoch unter diesen Bedingungen als nicht relevant (Abb. III.30a). Bei Test verschiedener Extraktanteile (SH- und M1-Gesamtextrakte) konnte ein 1:1 (v/v) Verhältnis der Extrakte als optimal ermittelt werden (Abb. III.30b). Die Erhöhung beider Extraktanteile im Vergleich zu den Basis-Assays (je 15% (v/v); siehe oben) auf je 45% (v/v) führte hierbei erwartungsgemäß zu einer Verdreifachung der SH-Aktivität. Die maximale Aktivität, welche durch Variation

der Gesamtextrakt-Anteile erreicht werden konnte, lag somit bei $8,9 \pm 1,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Assays, in denen nur der SH-Extrakt ohne Zugabe von *Cn* Reifungsfaktoren vorlag, zeigten keinerlei SH-Aktivität (Abb. III.30b).

Tabelle III.14 – Übersicht zu hergestellten ZFM-Extrakten und deren Einsatzgebieten.

Extrakt-Nr./-Art	Ausgangsplasmid^a	Eingesetzt in...
SH-Untereinheiten		
1A (HoxFUYH Wildtyp; SH4.wt)	pE_X(wt)_ <i>hoxY/hoxH/hoxU/hoxF</i>	allen Basis-, Deletions-, Substitutions- und Additions-Assays
1B (HoxUYH Wildtyp; StrepII-HoxF; SH4. Strep)	pE_X(wt)_ <i>hoxY/hoxH/hoxU_X(5')</i> _hoxF	Assays zur Reinigung der SH _{Var1} aus Assay-Ansätzen
1C (HoxFUYH Wildtyp; StrepII-HoxI; SH6.Strep)	pE_X(wt)_ <i>hoxY/hoxH_X(5')</i> _hoxI _X(wt)_hoxU/hoxF	Assays zur Reinigung der SH _{Var2} aus Assay-Ansätzen
M1- und M2-Gesamtextrakte		
2 (M1 Maturationssatz komplett)	pE_X(wt)_ <i>hypF2/hypE1/hypX/hoxW/hypC1hypD1/hypA2/hypB2</i>	allen M1-Gesamtextrakt-, Additions- und Pulldown-Assays
3 (M1 Maturationssatz komplett)	pE_X(wt)_ <i>hypX/hoxW/hypE2/hypF3/hypC2hypD2/hypA3/hypB3</i>	allen M2-Gesamtextrakt-, Additions- und Pulldown-Assays
M1- und M2-Einzelextrakte		
4 (HypA2B2) ← M1	pE_X(wt)_ <i>hypA2/hypB2</i>	M1-Kombinations-, Deletions-, Additions- und M2-Substitutions-Assays
5 (HypC1D1) ← M1	pE_X(wt)_ <i>hypC1/hypD1</i>	
6 (HypE1F2) ← M1	pE_X(wt)_ <i>hypF2/hypE1</i>	
7 (HypX/HoxW) ← M1 & M2	pE_X(wt)_ <i>hypX/hoxW</i>	M1- und M2-Kombinations-, Deletions- und Additions-Assays
8 (HypA3B3) ← M2	pE_X(wt)_ <i>hypA3/hypB3</i>	M2-Kombinations-, Deletions-, Additions- und M1-Substitutions-Assays
9 (HypC2D2) ← M2	pE_X(wt)_ <i>hypC2/hypD2</i>	
10 (HypE2F3) ← M2	pE_X(wt)_ <i>hypE2/hypF3</i>	

^a Nomenklatur für assemblierte Genkassetten: X(wt) = Pseudo-Wildtyp-Gen unter Kontrolle eines T7-Promoters und –Terminators; X(3′) = 3′-StrepII-getagtes Gen unter Kontrolle eines T7-Promoters und –Terminators; X(5′) = 5′-StrepII-getagtes Gen unter Kontrolle eines T7-Promoters und –Terminators. Für alle Genexpressionen wurde *E. coli* BL21Star™ (DE3) eingesetzt.

Die M1- und M2-Reifungssätze zeigten unterschiedliche Temperatur-Optima: Während die maximale Aktivität der M1-Proteine bei 30 °C lag, erreichten die M2-Proteine bei 37 °C den Maximalwert (Abb. III.30c). Bei diesen jeweils optimalen Temperaturen wurden für M1 und M2 im Gesamt- bzw. Einzelextrakt-Assay SH-Aktivitätsverläufe aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abb. III.30d dargestellt. Unabhängig von den eingesetzten Reifungssätzen und den korrespondierenden Temperatur-Optima wurde in allen Fällen nach ca. 45–50 min die maximale Aktivität erreicht, bevor diese im Anschluss wieder leicht (M1-Assays) bzw. deutlich (M2-Assays) absank (Abb. III.30d).

Nach Abschluss der Validierungs-Assays wurden die in Abschnitt III.4.2 und III.4.3 beschriebenen *in-vivo*-Reifungsexperimente auf das *in-vitro*-System übertragen. Dies ergab

ein teilweise verändertes Bild hinsichtlich der Essentialität und Fähigkeit zur Komplementation binärer Hyp-Komplexe als im *in-vivo*-Experiment. Abb. III.31 stellt die Ergebnisse dar.

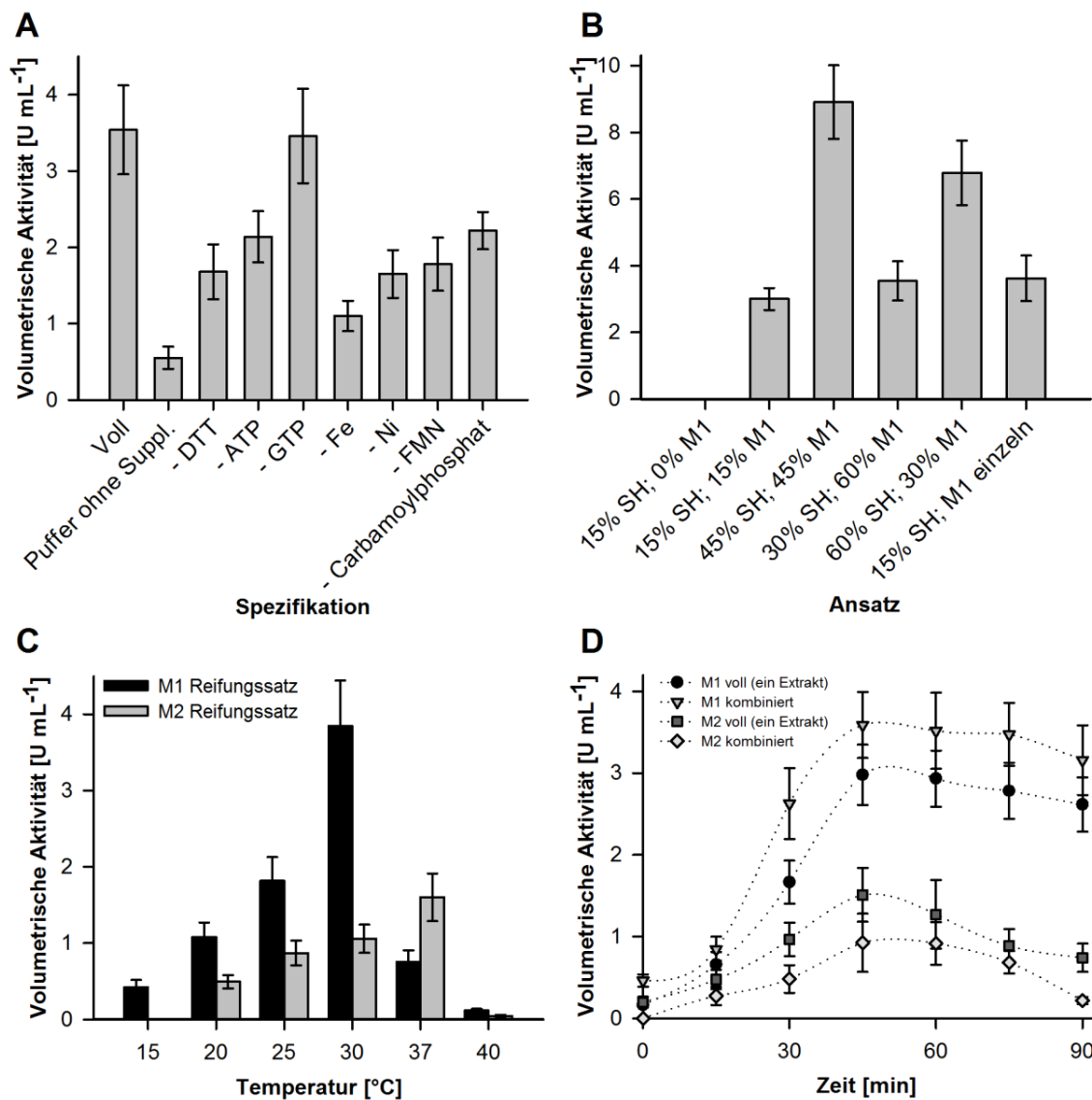


Abb. III.30 – Untersuchung optimaler Parameter zur zellfreien SH-Maturation mit Extrakten (ZFM). Das Standardvolumen der Assays lag bei 100 μ L. Assays wurden, mit Ausnahme von (D), nach 50 min gestoppt. (A) stellt die Ergebnisse zur Ermittlung essentieller Assay-Komponenten dar. Der Vergleichs-Assay mit allen benötigten Komponenten („Voll“) entspricht den in Tabelle II.7 angegebenen „Standard-Endkonzentrationen“ mit Extraktanteilen von je 15% (v/v) für den SH- bzw. M1/M2-Gesamtextrakt. In den übrigen Assays wurde je eine Komponente ausgelassen, wobei der Ansatz „Puffer ohne Suppl.“ lediglich die in Puffer verdünnten Extrakte ohne weitere Komponenten enthält. (B) zeigt den Einfluss verschiedener Verhältnisse der SH- und M1-Extrakte im Assay. „15% SH; M1 einzeln“ bezeichnet den Ansatz, in welchem anstelle des M1-Gesamtexttrakts die einzelnen Hyp-Extrakte (HypC1D1, HypA2B2, HypE1F2, HoxW & HypX) kombiniert wurden; (C) stellt den Einfluss der Temperatur bei Verwendung des M1/M2-Gesamtexttrakts dar; (D) zeigt repräsentative zeitliche Aktivitätsverläufe für M1- bzw. M2-ZFM-Assays. Legende: M1 voll = Je 15% (v/v) SH- und M1-Gesamtextrakt; M1 kombiniert = 15% (v/v) SH-Extrakt und je 7,5% HypC1D1-, A2B2-, E1F2 sowie HypX & HoxW-Extrakte; M2 voll & M2 kombiniert = analog den M1-Assays mit den Gesamt- oder einzelnen Extrakten für den M2-Satz. Zur statistischen Analyse wurden die Daten dreier unabhängiger Experimente ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen den hieraus berechneten Standardabweichungen.

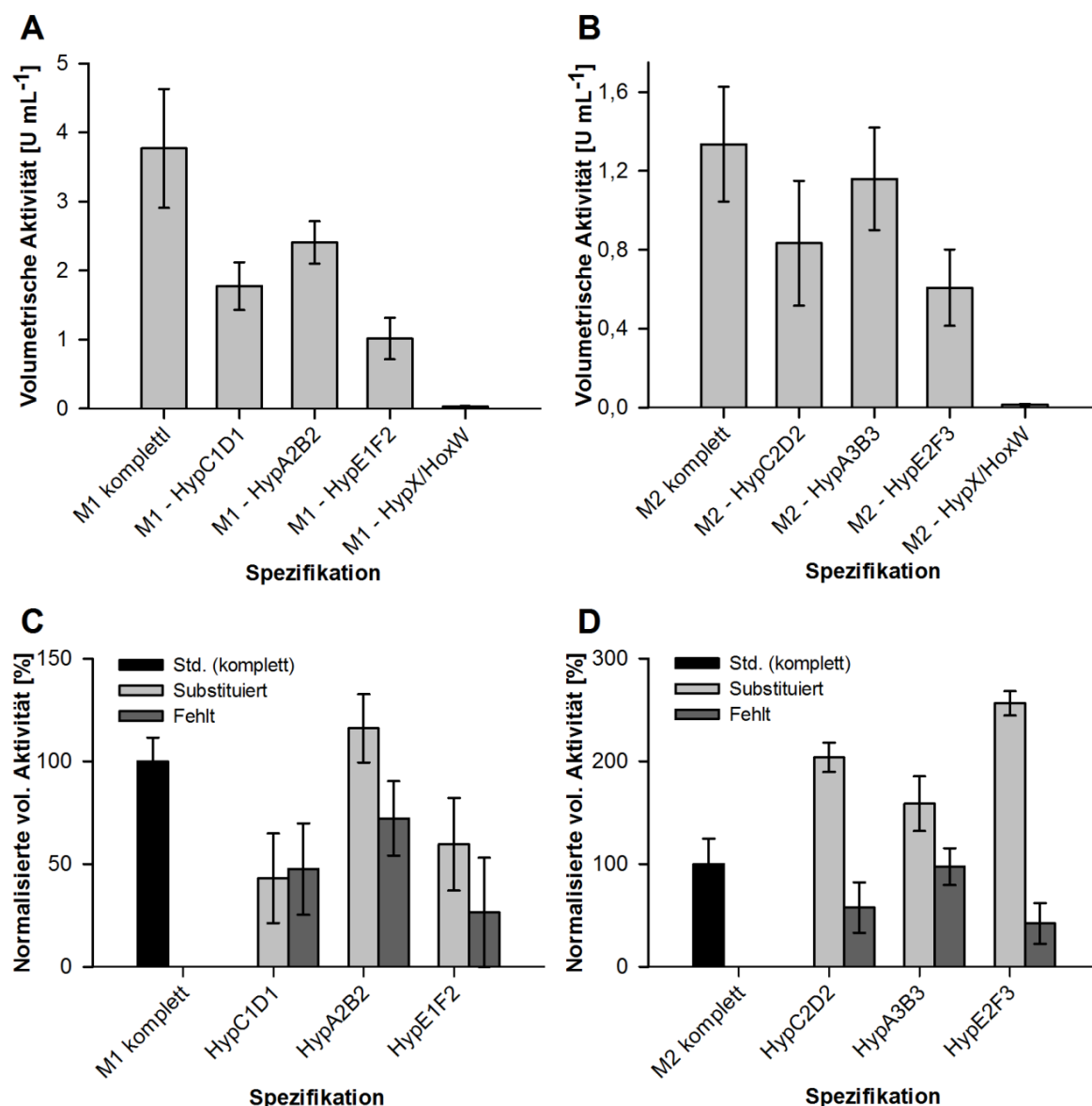


Abb. III.31 – Ergebnisse der Deletions- und Substitutions-Experimente im *in-vitro*-ZFM-System. Assays wurden in einem Standardvolumen von 100 μL unter den in Tabelle II.7 angegebenen „Standard-Bedingungen“ angesetzt, wobei anstelle des Gesamt-M1- oder M2-Extrakt-Einsatzes die Methode der kombinierten Einzelextrakte angewandt wurde. Alle Assays wurden nach 50 min gestoppt. (A) und (B) stellen die Ergebnisse der Deletions-Experimente dar. Die an der X-Achse angegebenen Maturasen wurden jeweils nicht zugegeben. M1 komplett = 15% (v/v) SH-Extrakt und je 7,5% (v/v) HypC1D1-, A2B2-, E1F2 sowie HypX & HoxW-Extrakte; M2 komplett = 15% (v/v) SH-Extrakt und je 7,5% (v/v) HypC2D2-, A3B3-, E2F3 sowie HypX & HoxW-Extrakte; (C) und (D) stellen die Daten aus den Deletions- („Fehlt“) und Substitutions-Experimenten („Substituiert“) vergleichend gegenüber. In den Substitutionsversuchen wurde anstelle des fehlenden Extrakts jeweils der analoge Extrakt des alternativen Reifungssatzes zugegeben (vgl. *in-vivo*-Experimente, Abb. III.29 und Tabelle III.13). Zur statistischen Analyse wurden die Daten dreier unabhängiger Experimente ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen den hieraus berechneten Standardabweichungen.

Entfernung von HoxW/HypX ergab hierbei den deutlichsten Effekt, wobei überraschend in beiden Fällen eine Restaktivität gemessen werden konnte: $0,030 \pm 0,008 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (M1; Abb. III.31a) bzw. $0,015 \pm 0,003 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (M2; Abb. III.31b). Bei Entfernung der HypCD-, HypAB- bzw. HypEF-Analoga ergab sich ein vergleichbares Muster für M1 und M2, wobei

der jeweils deutlichste Effekt bei Deletion von HypE1F2 (M1; 27% des Basis-Assays) sowie HypE2F3 (M2; 46% des Basis-Assays) zu beobachten war. Demgegenüber führten Entfernungen der HypCD- und HypAB-Analoga zu weniger deutlichen Aktivitätsverlusten (Abb. III.31a,b). In den zuvor gezeigten *in-vivo*-Experimenten konnte eine ähnliche Tendenz zwar für M1 beobachtet werden, im Falle von M2 hatte die HypE2F3-Deletion dort jedoch den geringsten Effekt auf die Aktivität (Abb. III.27 und Tabelle III.13). Generell prägten sich die Hyp-Deletionen im zellfreien System insbesondere für M1, sowie in geringerem Maße auch für M2, sehr viel geringer aus als im zellbasierten *in-vivo*-Maturationsystem.

Daraufhin wurde die Fähigkeit beider Reifungssätze zur gegenseitigen Komplementation untersucht (*in-vitro*-Substitutionsexperimente analog den in Abb. III.28 gezeigten *in-vivo*-Versuchen). Innerhalb der M1-Experimente erwies sich der HypE2F3-Komplex zur partiellen Komplementation von HypE1F2 befähigt, was anhand einer Verdopplung der Aktivität verglichen mit der HypE1F2-Deletion zu beobachten war (Abb. III.31a). Wie im *in-vivo*-Experiment bereits für M1 (partiell) und M2 (vollständig) demonstriert, waren beide HypAB-Analoga *in vitro* ohne Aktivitätsverlust substituierbar. Im Falle der M1-Experimente führte die HypA2B2-Substitution durch HypA3B3 sogar zu einer Aktivitäts-Erhöhung (116% des Basis-Assays; Abb. III.31a). Komplementation der M2-Deletions-Ansätze durch die analogen M1-Hyp-Komplexe führte in allen Fällen zu deutlichen Steigerungen der SH-Aktivität (Abb. III.31b). Dieser Effekt erreichte im HypE1F2-Substitutions-Assay die maximale Ausprägung. Die innerhalb dieses Assays gemessene SH-Aktivität lag bei $3,3 \pm 0,4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, was dem 2,6fachen Wert des M2-Basis-Assays und 96% der Aktivität des M1-Basis-Assays entspricht. Im Zuge der Tests verschiedener SH- und M1-Gesamtextrakt-Anteile im Assay war zuvor bei Erhöhung des M1-Anteils keine substantielle Steigerung der resultierenden Aktivität beobachtet worden (Abb. III.30b). Dies erlaubte jedoch noch keine Aussage über mögliche Aktivitäts-Erhöhrungen durch individuelle Hyp-Komplexe, resultierend aus deren Limitierung innerhalb des Gesamtexttrakts (relativ zu den übrigen Maturasen). Um diese Fragestellung genauer zu beleuchten, wurde den Gesamtextrakt-Assays Hyp-Einzelextrakte (Tabelle III.14) mit Anteilen von 15% (v/v) zugefügt. Dies führte im Falle von M1, mit Ausnahme des HypC1D1-Extrakts, zu deutlichen SH-Aktivitätssteigerungen (Abb. III.32a). Addition des HypX/HoxW-Extrakts erhöhte die Aktivität von $3,3 \pm 0,4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Basis-Assay) auf $8,4 \pm 1,5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (2,6fache Erhöhung). Noch deutlicher prägte sich die Zugabe des HypE1F2-Extrakts aus: Innerhalb des korrespondierenden Ansatzes konnte eine SH-Aktivität von $11,5 \pm 2,4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ gemessen werden, was einer mehr als 3,5fachen Steigerung und damit der höchsten in dieser Arbeit erreichten ZFM-Aktivität entspricht (Abb. III.32a). Dieser Wert entspricht

umgerechnet einer spezifischen Aktivität von $1,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bezogen auf den Gesamtproteingehalt, sowie $3,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ bezogen auf den Proteinanteil des SH-Extrakts. Im Gegensatz dazu zeigten die Extrakt-Additionen im M2-Assay mit Ausnahme des HypX/HoxW-Extrakts (Erhöhung der SH-Aktivität auf ca. 1,5fachen Wert im Vergleich zum M2-Basis-Assay) eher vernachlässigbare Effekte in Form von minimalen Steigerungen der volumetrischen Aktivität (Abb. III.32b).

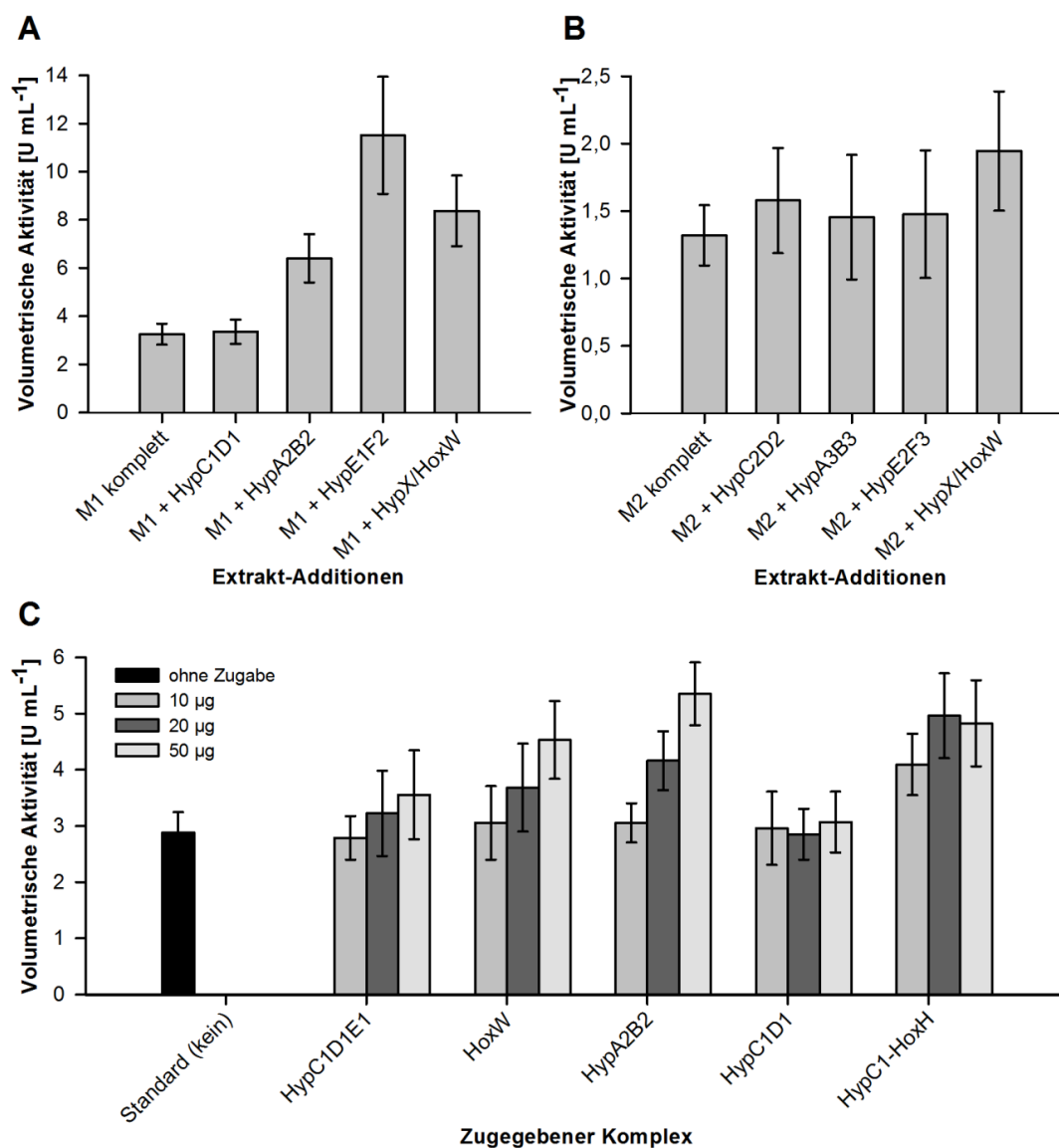


Abb. III.32 – Effekte bei Addition von Hyp-Extrakten bzw. gereinigten Hyp-Komplexen im ZFM-System. Assays wurden in einem Standardvolumen von $100 \mu\text{L}$ unter den in Tabelle II.7 angegebenen „Standard-Bedingungen“ angesetzt und nach 50 min gestoppt. SH-Extrakte in Kombination mit M1/M2-Gesamtexttrakten bildeten die Basis aller Additions-Assays. (A) und (B) stellen die Ergebnisse bei Zugabe von zusätzlichen 15% (v/v) des jeweiligen an der X-Achse angegebenen Extrakts zum Assay für den M1- (A) bzw. M2-Satz (B) dar. (C) zeigt die Effekte bei Zugabe der in Abschnitt III.4.1 gezeigten isolierten Hyp-Proteine und –Komplexe (vgl. Abb. III. 20 & Abb.III.21) zu M1-Gesamtextrakt-Assays. Hierbei wurden dem Assay jeweils 10, 20 bzw. $50 \mu\text{g}$ der gereinigten Proteine hinzugefügt (siehe Legende). Zur statistischen Analyse wurden die Daten dreier unabhängiger Experimente ausgewertet. Die Fehlerbalken entsprechen den hieraus berechneten Standardabweichungen.

Das ZFM-System bot darüber hinaus die Möglichkeit, die Funktionalität der in Abschnitt III.4.1 gereinigten individuellen Hyp-Proteine und –Komplexe zu testen. Hierzu wurden entsprechende Verdünnungen der Präparationen vorgenommen und diese anschließend den M1-Gesamtextrakt-Assays in definierten Mengen (10, 20 bzw. 50 µg) zugesetzt. Abb. III.32c zeigt die Resultate dieser Experimente. Mit Ausnahme des HypC1//StrepII-HypD1-Komplexes, dessen Zugabe bereits bei Einzelextrakt-Zugabe keinerlei Aktivitätssteigerung zur Folge hatte (Abb. III.32a), bewirkten alle Additionen Erhöhungen der volumetrischen SH-Aktivität. Die Funktionalität des HypC1D1-Komplexes konnte jedoch im Verbund mit HypE1 (trinärer Komplex) demonstriert werden, da der gereinigte HypC1-StrepII//HypD1//HypE1-Komplex, ebenso wie StrepII-HoxW und HypA2//StrepII-HypB2, ab einer zugegebenen Menge von 20 µg eine Erhöhung der SH-Aktivität bewirkte (Abb. III.32c). Im Falle des StrepII-HypC1//HoxH-Komplexes konnte dieser Effekt bereits bei Zugabe von 10 µg beobachtet werden. Folglich kann auch HoxH trotz der besseren Löslichkeit verglichen mit HoxF, U und Y innerhalb des Systems als limitierend angesehen werden. Bei Betrachtung von HoxH als katalytisches Substrat des Reifungsapparats könnten hier auch kinetische Limitierungen von Bedeutung sein. Die deutlichste Aktivitätssteigerung zeigte der HypA2//StrepII-HypB2-Komplex, dessen Zugabe eine Erhöhung der SH-Aktivität auf $5,4 \pm 0,6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ zur Folge hatte (50 µg; Abb. III.32c). Zum Vergleich: Die SH-Aktivität des Basis-Assays in diesem Experiment lag bei $2,9 \pm 0,4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Die bisher gezeigten ZFM-Assays verdeutlichten, dass SH-Extrakte, in denen keinerlei M1- oder M2-Proteine vorliegen, *in vitro* durch Zugabe entsprechender Maturasen aktiviert werden können. Dies lässt den Schluss zu, dass alle SH-Untereinheiten selbst ohne abgeschlossene Assemblierung des Holoenzym in ihrer löslichen Form produziert werden können und innerhalb des Basis-Extrakts vorliegen. Unter Einsatz der StrepII-getaggten SH Varianten (StrepII-HoxF bei tetramerer SH_{Var1} ← Extrakt 1B; StrepII-HoxI bei hexamerer SH_{Var2} ← Extrakt 1C; Tabelle III.14) wurde daher untersucht, ob eine Isolierung des assemblierten Holoenzym bzw. korrespondierender SH-Intermediate direkt aus den ZFM-Ansätzen möglich ist. Im Vorfeld konnte die Aktivierung der 1B- und 1C-Extrakte analog zu dem 1A-Extrakt (Wildtyp-SH) erfolgreich demonstriert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Reinigung der Varianten wurden daraufhin Assays für maximale Enzymausbeute (je 45% (v/v) 1B- oder 1C- und 45% (v/v) M1-Gesamtextrakt) auf ein Volumen von 1 mL hochskaliert. Im Falle der SH_{Var2} (1C-Extrakt) wurden hierzu Extrakte, welche mit 50 mM KPi pH 7,0 + 5 mM MgCl₂ anstelle des üblichen Tris-Puffers hergestellt wurden, eingesetzt. Damit wurde dem Stabilitäts-Defizit der hexameren SH unter abweichenden

Pufferbedingungen entsprochen (vgl. Abschnitt III.3.2). Die Reaktionen wurden gemäß Standardverfahren nach 50–55 min gestoppt. Zu diesem Zeitpunkt konnten volumetrische Aktivitäten von $6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ [$\cong 0,29 \text{ U} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$] bzw. $6,45 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ [$\cong 0,38 \text{ U} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$] für SH_{Var1} bzw. SH_{Var2} gemessen werden. Je 500 μL der Reaktionsansätze wurden anschließend mittels StrepTactin SpinColumns gereinigt, wobei Tris- (SH_{Var1}) bzw. KPi-Puffer (SH_{Var2}) als Puffer-Basis verwendet wurde (Abb. III.33a,b).

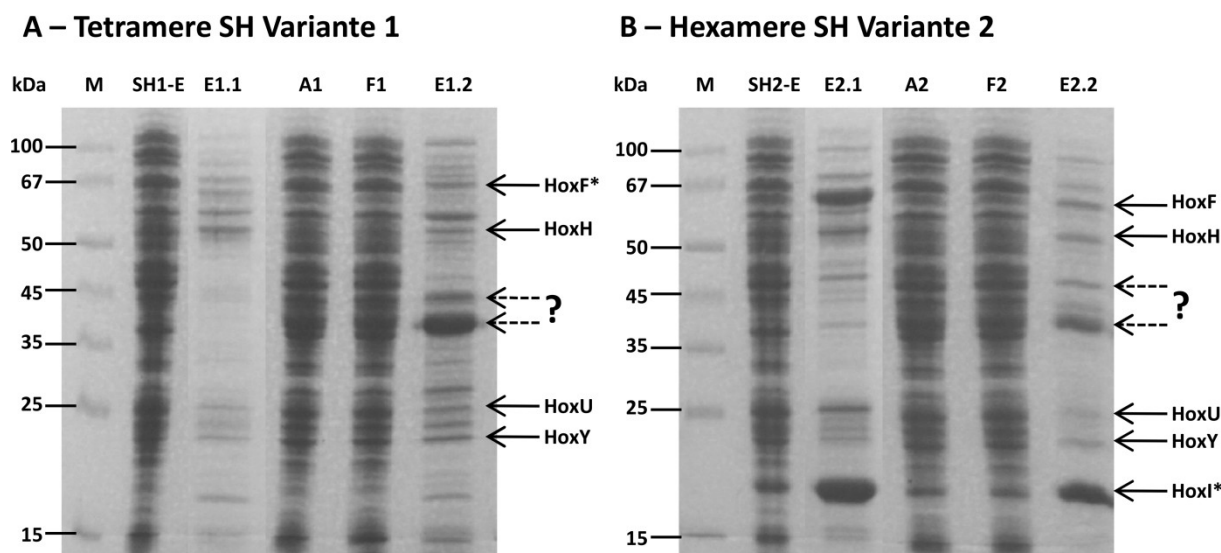


Abb. III.33 – Experimente zur Isolierung von SH-Komplexen und –Intermediaten aus ZFM-Ansätzen. Für beide StrepII-getaggtten SH Varianten (A: SH_{Var1}; B: SH_{Var2}) wurden jeweils zwei Affinitätsreinigungen mittels StrepTactin SpinColumns vorgenommen: Für die erste Reinigung wurde der unbehandelte SH-Gesamtextrakt ohne vorherige Reifung auf die Säule geladen (SH1-E bei SH_{Var1}; SH2-E bei SH_{Var2}; siehe Tabelle III.14: Extrakte 1B bzw. 1C), resultierend in Elutionsfraktionen mit partiell gereinigten SH-Untereinheiten, die keinerlei Aktivität aufwiesen (E1.1 bei SH_{Var1}; E2.1 bei SH_{Var2}). Die jeweils zweite Reinigung erfolgte direkt aus ZFM-Ansätzen (A1 bei SH_{Var1} & A2 bei SH_{Var2}; Großansätze à 1.000 μL mit je 45% (v/v) der 1B/1C sowie des M1-Gesamtexttrakts). F1 und F2 stellen die Durchfluss-Fraktionen der Reinigungen dar. Die Elutionsfraktionen der SH-Isolierungen aus Ansätzen (E1.2 bei SH_{Var1}; E2.2 bei SH_{Var2}) zeigten veränderte Muster gegenüber den Extrakt-Reinigungen, möglicherweise resultierend aus koeluierten Reifungsfaktoren. Die dominanten Banden im Bereich 35–45 kDa entsprechen den Größenbereichen von HypB2, HypE1 und HypD1 (mit einem „?“ markiert). Die SH_{Var1}-Reinigungen erfolgten mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 75 mM KCl als Pufferbasis, während für SH_{Var2} (zur Stabilisierung der hexameren Struktur) 50 mM KPi pH 7,0 eingesetzt wurden. Es wurden jeweils 4·100 μL Waschfraktionen gesammelt (nicht gezeigt). Aktivitäten sind im Text angegeben.

In den Elutionsfraktionen konnten spezifische Aktivitäten von $5,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{Var1}) bzw. $5,8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ (SH_{Var2}) gemessen werden. Um die Art der Kontaminanten bzw. der koeluierten Proteine einordnen zu können, wurden die für den jeweiligen Assay eingesetzten Basis-Extrakte (1B bzw. 1C; je 500 μL) einer analogen Reinigungsprozedur unterzogen. Überraschend beinhalteten die daraus erhaltenen Eluate alle SH-Untereinheiten. Obwohl eine Komplexbildung daher als wahrscheinlich angesehen werden kann, konnte in den Fraktionen erwartungsgemäß keinerlei SH-Aktivität gemessen werden. Im Falle des 1C-Extrakts (SH_{Var2})

zeigte die SDS-PAGE-Analyse des Eluats (E2.1) einen deutlichen stöchiometrischen Überschuss des HoxFUI₂-Diaphorasemoduls (Abb. III.33b). Bei direktem Vergleich der Extrakt- und Assay-Eluate für jede Variante wurde deutlich, dass bestimmte M1-Hyp-Proteine oder –Komplexe mit den Enzymen koeluierten. Diese lagen innerhalb der Assay-, jedoch nicht der Extrakt-Eluate vor (vgl. Abb. III.33a,b: E1.1 vs. E1.2 und E2.1 vs. E2.2). Anhand des Größenbereichs dieser ‚Kontaminanten‘ im Bereich 35–45 kDa könnte es sich hierbei um HypB2 (ca. 35 kDa), HypE1 (ca. 37 kDa) und/oder HypD1 (ca. 41 kDa) gehandelt haben. Die Möglichkeit, derartige Reifungsintermediate künftig direkt erfassen zu können („Pulldown-Assays“), könnte zahlreiche neue Erkenntnisse über den bisher in vielen Aspekten noch ungelösten Prozess liefern. Eine direkte Komplexbildung mit der katalytischen Untereinheit HoxH wurde zuvor lediglich für HypC ([180] und diese Arbeit: Abb. III.21a,h) sowie HypX (diese Arbeit: Abb. III.21g) demonstriert.

IV DISKUSSION

Die bidirektionale NAD^+ reduzierende [NiFe]-Hydrogenase (*soluble hydrogenase*, SH) aus *Cupriavidus necator* (*Cn*; ehemals *Ralstonia eutropha* H16) gehört zu den am besten untersuchten H_2 -aktivierenden Enzymen überhaupt. Die biotechnologische Relevanz der SH resultiert primär aus der O_2 -Toleranz des Enzyms [264]. Diese Eigenschaft, welche die enzymatische H_2 -Umsetzung in Anwesenheit von Sauerstoff ermöglicht, eröffnet potentiell Anwendungen im Bereich enzymbasierter Brennstoffzellen [277,278,350,351], Sensoren für H_2 [352,353], gekoppelter Biokatalysen mit 100%iger Kofaktor-Regeneration [274,275] und lichtgetriebener Wasserstoffproduktion aus H_2O via Kopplung mit cyanobakteriellen Photosystemen [268,269,281]. Obwohl alle drei bekannten *Cn* Hydrogenasen (SH, MBH und RH; Abschnitt I.3 und [221]) die Eigenschaft der O_2 -Toleranz besitzen, sind die dafür verantwortlichen Mechanismen für jedes der Enzyme unterschiedlich. Die RH schirmt das aktive Zentrum durch verengte Gaskanäle ab, die das O_2 -Molekül nicht passieren kann [138]. Im Falle der MBH ist der Mechanismus wesentlich komplexer und wurde erst kürzlich durch Analyse der Kristallstrukturen des *Cn* Enzyms [103] sowie eines weiteren analogen Vertreters der Enzymgruppe aus *Hydrogenovibrio marinus* [106] entschlüsselt. Innerhalb dieser Enzyme fungiert ein außergewöhnliches, in unmittelbarer Nachbarschaft zum [NiFe]-Zentrum gelegenes redoxplastisches [4Fe-3S]-Cluster mit drei physiologischen Oxidationszuständen wahrscheinlich als Knotenpunkt zur raschen reduktiven Entsorgung gebundener Sauerstoffspezies [227]. Für die SH konnte bisher weder der RH-, noch der MBH-Mechanismus nachgewiesen werden. Die strukturelle Besonderheit des Enzyms im Vergleich zu typischen Vertretern der Gruppe 3d-[NiFe]-Hydrogenasen (Abschnitt I.2.2.3.2) ist der FMN-a Kofaktor der HoxY-Untereinheit. Wie bereits in Abschnitt I.3.3 ausgeführt, ist dieser Kofaktor zusammen mit dem HoxF-gebundenen FMN-b als Schlüsselmotiv hinsichtlich der O_2 -Toleranz der SH im Gespräch ([246,247,253] und Abschnitt IV.8).

Das Beispiel der unterschiedlichen Mechanismen zur O_2 -Toleranz macht deutlich, dass selbst bei Enzymen, deren Untersuchung bereits Jahrzehnte andauert, noch immer Wissensdefizite existieren. Die Aufklärung der molekularen Architektur von [NiFe]-Hydrogenasen stellt somit insbesondere hinsichtlich der O_2 -Abwehrmechanismen nach wie vor eine der anspruchsvollsten strukturanalytischen Disziplinen dar. Unmittelbar damit verbunden sind die zellulären Strategien zur Assemblierung des katalytisch aktiven Holoenzym. Hierbei wurde im Laufe der letzten zwanzig Jahre ein Gerüst von sieben bis acht Basis-Hilfsproteinen (HypABCDEF, eine spezifische Protease sowie in manchen Organismen SlyD [157]) entschlüsselt, von welchem homologe Proteine in allen [NiFe]-Hydrogenase beherbergenden

Organismen gefunden bzw. vermutet werden [157]. In den Genomen von Spezies, die O₂-tolerante Enzyme beherbergen, wurden teilweise zusätzliche Gene identifiziert, deren Genprodukte bereits in manchen Fällen in direkte Korrelation mit dieser spezifischen Eigenschaft gebracht werden können (Abschnitt IV.8).

Im Falle von Enzymen, welche weitgehend ohne aufwendige posttranslationale Modifikation funktional synthetisiert werden können und deren kodierende Gene bekannt sind, bietet sich meist die Produktion der Zielkomponente(n) in einem heterologen System an. Auf diese Weise wird in der Regel die Produktion vergleichsweise großer Mengen des rekombinanten Proteins ermöglicht und dieses kann folglich Reinigungs-, Charakterisierungs- und strukturanalytischen Untersuchungen besser zugänglich gemacht werden. Durch den Transfer der genetischen Information in eine heterologe Umgebung wird darüber hinaus die Kopplung an neue genetische Module oder Stoffwechselwege erlaubt. Die Zielkomponente wird in gewisser Weise „verfügbar“ gemacht, wodurch die zuvor am Beispiel O₂-toleranter [NiFe]-Hydrogenasen verdeutlichten grundlagenorientierten Arbeiten substantiell beschleunigt werden können. Grundsätzlich sind – abgesehen von wenigen, in jüngerer Zeit bewerkstelligten Versuchen (Abschnitt IV.3) – zwei Kernprobleme für den Mangel an erfolgreichen Transplantationen kompletter [NiFe]-Hydrogenase kodierender Module zu benennen. Einerseits beschränkt sich die derzeitige Kenntnis über den Reifungsprozess auf das zuvor genannte universelle Hyp-Gerüst. Dadurch wird gerade die Produktion solcher Enzyme erschwert, deren Eigenschaften von denen der „Standard-Hydrogenasen“ abweichen, da diese wie oben erwähnt teilweise noch nicht charakterisierte Genprodukte zur funktionalen Reifung benötigen. Andererseits stoßen verfügbare molekularbiologische Werkzeuge an die Grenzen der Anwendbarkeit, da diese hinsichtlich des Transfers und der Expression multipler Gene selbst im Falle von *E. coli* erheblichen Limitierungen unterworfen sind ([279,280] und Abschnitt IV.1). Wie bereits innerhalb der Zielsetzung formuliert (Abschnitt I.5), stellte die Bewältigung eben dieser Problematik eines der zentralen Themen dieser Arbeit dar.

IV.1 Eine kombinatorische, modulare Multigen-Expressionsplattform

Zur Beschreibung des entwickelten Klonierungs- und Expressionswerkzeugs bedarf es einer Unterscheidung zwischen der Klonierungsbasis, welche der von Selmer und Pinkenburg entwickelten StarGate[®]-Technologie (IBA, Göttingen) entspricht [304], sowie der Implementierung einer kombinatorischen, modularen Multigen-Expressionsplattform (diese Arbeit). Analog zu dem Gateway[®]-System (Invitrogen) [354] ist das Basis-System dergestalt aufgebaut, dass ein Zielgen zunächst in einen Entry-Vektor (hier: pE/pENTRY; Abschnitt

III.1.1) transferiert wird. Das Entry-Konstrukt erlaubt daraufhin die Subklonierung des „fixierten“ ORFs in einen Zielvektor der Wahl. Zielvektoren können Expressionsvektoren (mit Regulations- und Erhaltungselementen für eukaryotische oder prokaryotische episomale Genexpression) oder *Upstream-* bzw. *Downstream-*Fusionsvektoren (für die Assemblierung mehrerer Gene zu einem polycistronischen Modul) sein [304]. Im Falle einer Fusionsklonierung erfolgt die Verknüpfung wieder innerhalb des Entry-Vektors (Abb. III.3, III.4). Somit beschränkt sich die Subklonierungs-Kaskade auf zwei alternierende Transferschritte, in denen ein Entry-Vektor/-Konstrukt entweder als Donor oder Akzeptor fungiert. Das StarGate[®]-System nutzt hierzu Typ IIs-Restriktionsendonukleasen [355,356]. Diese schneiden außerhalb der Erkennungssequenz und generieren dadurch beliebige, durch Primer- und Vektordesign im Vorfeld festgelegte 3- bzw. 4-Basen Überhänge (Abb. III.3). Die Vektoren innerhalb des StarGate[®]-Systems sind hierbei durch konvergente bzw. divergente Anordnung der Donor-/Akzeptor-Erkennungssequenzen zueinander so designt, dass der geschnittene Donorvektor seine ursprüngliche Erkennungssequenz verliert. Auf diese Weise wird der Transfer vollständig in Richtung des Produkts dirigiert, resultierend in einer Effizienz nahe 100%. Restriktion (Enzyme: *LguI* bzw. *Esp3I*) und Ligation werden in einer Ein-Schritt-Reaktion kombiniert [304].

Die Erweiterung des Basis-Systems um die pFXT7- sowie Duet[™]-abgeleiteten kompatiblen Expressionsplasmide erfolgte innerhalb dieser Arbeit als Reaktion auf die in Abschnitt III.1.2.1 dargestellte Problematik bei polycistronischer Assemblierung der *Cn* Strukturgene *hoxFUYHI*. Die Translationsabbrüche nach dem ersten Gen innerhalb bicistronischer Varianten stellten hierbei ein Phänomen dar, welches mit gewisser Wahrscheinlichkeit mit bestimmten mRNS-Sekundärstrukturen begründet werden kann, welche die Verfügbarkeit der ribosomalen Bindestelle erschweren oder verhindern. Diese Annahme deckt sich mit dem vergleichsweise hohen GC-Gehalt der *Cn* Gene (Ø Strukturgene 60%) und der Tatsache, dass die Problematik in Einzelfällen durch Veränderung der Genreihenfolge umgangen werden konnte (Abschnitt III.1.2.1). Da das jeweils erste Genprodukt stets in zufriedenstellenden Mengen synthetisiert wurde, war die Stabilität der bicistronischen Transkripte offenbar gewährleistet. Der Grund musste daher in der Ausbildung ungünstiger Sekundärstrukturen der 3'-Region des ersten Gens sowie der 5'-Region des zweiten Gens liegen. GC-reiche Sequenzen könnten derartige Loop-Strukturen begünstigen [357,358]. Dies könnte als Grund dafür angenommen werden, dass die Problematik sich im Falle der M1 und M2 Reifungsgene (GC-Gehalt Ø 65%) gravierender darstellte. Während eine polycistronische Reihenfolge für die SH-Gene ermittelt werden konnte, war dies im Falle der 16 Reifungsgene nicht möglich.

Zur raschen Umgehung dieser Problematik entwickelten wir innerhalb dieser Arbeit die pFnT7- und pFcT7-Vektoren, welche einen analogen Aufbau wie die StarGate®-Fusionsvektoren aufweisen, die Zielgene jedoch unter Kontrolle eigener T7-Promotoren und – Terminatoren stellen (Abb. VI.43). Aufgrund analoger Klonierungsschnittstellen zu den regulären Fusionsvektoren erfolgten Transferreaktionen zur Modul-Assemblierung in gleicher Weise (Abschnitt III.1.2.2). Dies eröffnete darüber hinaus die Möglichkeit der modularen Assemblierung und des unmittelbaren Expressionstests jedes intermediären Plasmidkonstrukts. Affinitäts-Tags konnten bei Bedarf mit jedem Gen innerhalb eines Multigen-Moduls fusioniert werden, was bei der klassischen Assemblierungsmethode (siehe oben) lediglich für das erste (5') bzw. letzte Gen (3') möglich war. Ein Element, was sich hingegen weiterhin als nicht steuerbar erwies, war das Expressionslevel jedes einzelnen Gens eines Multigen-Moduls, erfassbar anhand der Abundanz der Genprodukte innerhalb des Ganzzell-Lysats bei Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. III.7, III.8, III.13b). Im Falle polycistronischer Transkripte ist bekannt, dass das Expressionslevel sequentiell verknüpfter Gene mit zunehmender Entfernung zum Promotor abnimmt [359,360]. Im Falle von individuellen Transkriptionseinheiten können die Mengen rekombinanter Genprodukte im Vergleich zum polycistronischen Konstrukt üblicherweise signifikant erhöht werden [359,361,362]. Dies lässt jedoch nicht den Schluss zu, dass die rekombinanten Proteine im äquimolaren Verhältnis synthetisiert werden. Die Abundanz eines Zielproteins wird maßgeblich von seiner eigenen Stabilität, Löslichkeit und proteolytischen Exposition, sowie andererseits von der Syntheserate, Stabilität und Halbwertszeit der korrespondierenden mRNS bestimmt [357,358]. Aus diesem Grund erschien es nicht verwunderlich, dass bei Analyse von Ganzzell-Lysaten Multigen-exprimierender Teststämme individuelle Genprodukte in variablem Verhältnis vorlagen (Abb. III.7, III.8, III.13b).

Zwar kann in bestimmten Anwendungsfällen die Nutzung eines einzelnen episomalen Vektors, welcher mit allen Zielgenen als Polycistron oder als individuelle Transkriptionseinheiten bestückt wird, ausreichend sein [282,363-368]. Die Möglichkeit, Gene bzw. Genkassetten auf verschiedene Vektoren mit unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzgenen sowie Replikationsursprüngen verteilen zu können, hat jedoch einige entscheidende Vorteile. Zum einen werden kombinatorische Studien ermöglicht, wenn die Funktion und/oder Essentialität eines Genprodukts innerhalb eines Biosynthesewegs zu Beginn der Studie nicht geklärt ist. Der Reifungsapparat einer [NiFe]-Hydrogenase bietet hierfür ein bekanntes Beispiel. Hierbei kann es darüber hinaus von Vorteil sein, ein bestimmtes Modul (hier: SH Strukturgene) von einem zweiten Modul (hier: Reifungsgene) zu

trennen, um i) die Gendosis eines der beiden Module, partiell steuerbar über den Replikationsursprung des Zielvektors, gegenüber dem anderen zu erhöhen; ii) innerhalb von Deletions- oder Substitutions-Experimenten Genkassetten innerhalb *eines* Moduls zu entfernen oder auszutauschen, während das andere nicht verändert wird; iii) eine induktive Expressionsentkopplung von Modulen durch unterschiedliche Regulationseinheiten zu erzielen (Stämme SHdec1, SHdec2; Tabelle III.6). Das Duet™-System (Novagen) enthält Vektoren mit vier verschiedenen Antibiotika-Resistenzgenen sowie vier verschiedenen Replikationsursprüngen [369]. Innerhalb dieser Arbeit designten wir daher zwei mit dem entwickelten Klonierungssystem kompatible Expressionsvektoren ausgehend von den Duet™-Vektoren und assemblierten diese. Die beiden resultierenden Plasmide, pSm.CDF.3a (CloDF; Sm^R) und pAmp.RSF.3a (RSF; Amp/Carb^R), boten folglich die Möglichkeit zur Koexpression von Genmodulen in einer Zelle zusammen mit pE-Konstrukten (ColE1; Kan^R).

Die Fortschritte der vergangenen zwanzig Jahre in den Bereichen *Metabolic engineering* und der synthetischen Biologie sind zweifellos unmittelbar mit den bahnbrechenden Entwicklungen der „omics“ (*Genomics, Metabolomics, Proteomics*) verknüpft [370,371]. Im Zuge der Knüpfung neuer metabolischer Netzwerke, Implementierung von Stoffwechselwegen (oder allgemein: Biosynthesewegen) sowie Design maßgeschneiderter Mikroben inklusive der Manipulation komplexer regulatorischer Zusammenhänge wächst der Anspruch an molekularbiologische Basiswerkzeuge. Hierbei stellt sich die Suche nach einheitlichen Strategien als schwierig heraus: Eingesetzte gentechnische Werkzeuge variieren zwischen einzelnen Arbeitsgruppen und generierte Stämme fungieren oftmals lediglich als Demonstratoren, so dass die Anwendung oder Adaption derselben außerhalb des jeweiligen Labors erschwert wird [372].

Die konventionelle Methode zur Insertion einzelner ORFs oder eines PCR-generierten polycistronischen DNS-Strangs in einen Expressionsvektor erfolgt durch Restriktion-Ligation. Dieses Vorgehen ist meist zeitaufwendig und wenig effizient. Dennoch findet es nach wie vor Anwendung, wobei oftmals maßgeschneiderte Vektoren zum Einsatz kommen [282,287,364,365,367,368]. Auf diese Weise hergestellte polycistronische Konstrukte zeigen meist die bereits benannten Limitierungen (siehe oben): Sie sind geeignet, um die Synthese eines Produkts oder mehrerer Produkte zu demonstrieren, zielen jedoch meist nicht auf hohe Ausbeuten des Stoffwechselprodukts oder Biokatalysators ab. Die konventionelle Klonierung wurde in vielen Fällen durch deutlich flexiblere und effizientere Rekombinations-Technologien ersetzt, welche als ligationsunabhängig bezeichnet werden (LIC = *ligation independent cloning*). Hierunter fällt unter anderem die Gateway[®]-Technologie (Invitrogen)

[354]. Eine mittlerweile vielfach eingesetzte LIC-Methodik nutzt Einzelstrang-Hybridisierung homologer endständiger Sequenzen [373,374]. Hierbei enthalten die Fusionspartner⁴ homologe, d. h. überlappende Sequenzen, welche für das folgende Hybridisierungs-Ereignis als Einzelstränge vorliegen müssen. Statt mit Restriktionsenzymen werden die Einzelstränge entweder mit T4 DNS-Polymerase (welche 3'→5' Exonuklease-Aktivität besitzt) oder alternativ durch eine spezielle Form der PCR (*iPCR* = *incomplete* PCR) erzeugt. Im Falle der T4-Polymerase wird die 3'→5' Verkürzung dadurch gesteuert, dass eines der vier dNTPs der Reaktion zugesetzt wird. Dies führt zu einem Stopp der Reaktion an der Stelle in der Sequenz, wo das Enzym erstmalig auf die korrespondierende Base trifft. Die homologen Einzelstränge hybridisieren anschließend und werden ohne vorherige Ligation in die kompetenten Zellen transformiert. Durch den Einsatz der T4-Polymerase ist diese Methodik stark sequenzabhängig. Eine alternative Methode, SLIC (*sequence and ligation independent cloning*) macht sich die RecA-abhängige homologe Rekombination *in vitro* zunutze und wird als sequenzunabhängig bezeichnet, da hier kein unmittelbarer Stopp der Verkürzung vorgenommen wird. Die resultierenden Aussparungen (sogenannte „gaps“) werden durch die zelluläre Maschinerie *in vivo* repariert [375,376]. Allerdings ist die Methode dadurch anfällig für unspezifische Rekombinationsereignisse und weniger effizient [377].

Die LIC-Methode im Verbund mit speziell designten Vektoren wurde seit der Jahrtausendwende vielfach eingesetzt. In nahezu allen Fällen waren die Systeme jedoch für die Aufnahme von maximal zwei [378] bis vier Genen [367,368] konzipiert. Lediglich ein System beinhaltete den Einsatz mehrerer kompatibler Vektoren [379]. Dieses System sah insgesamt drei Vektoren vor, welche jedoch nur jeweils ein Gen aufnehmen konnten. Kommerziell erschienene Systeme sind beispielsweise das Creator[®]/In-Fusion[®] System (Clontech) [380-382], sowie die am EMBL entwickelten und von Geneva Biotech vertriebenen Acembl- (für *E. coli*) bzw. MultiBac-Systeme (Baculovirus-Expressionssystem) [383-385]. Die EMBL-Systeme kombinieren die (S)LIC-Technik mit der Verfügbarkeit multipler Aufnahmeseiten (konventionelle Restriktion-Ligation) sowie mit dem Cre/loxP-System, welches zur Subklonierung eingesetzt wird.

Der große Vorteil der (S)LIC-basierten Systeme liegt in der Möglichkeit zur Automatisierung. Darüber hinaus bietet das Acembl-System als einzige momentan verfügbare Plattform die Möglichkeit des reversiblen Modulaufbaus und -abbaus: Ein aus einzelnen

⁴ Die Fusionspartner im (S)LIC-System sind im klassischen Fall ein Gen und ein Akzeptorvektor. Jedoch können theoretisch beliebig viele Gene/Fragmente simultan fusioniert werden oder in einer vorher bestimmten Reihenfolge in einen Vektor transferiert werden. Die Rekombinationsereignisse werden hierbei über homologe überlappende Sequenzen gesteuert, so dass die Gen-/Fragment-Anzahl prinzipiell nicht limitiert ist.

Transkriptionseinheiten oder als Polycistron assembliertes Multigen-Modul kann schrittweise wieder abgebaut werden [384]. Was die (S)LIC-Systeme gegenüber dem in dieser Arbeit vorgestellten System zweifellos attraktiv macht ist die Tatsache, dass die Zielgene (sofern nicht ein konventioneller Restriktions-/Ligations-Schritt Einzug hält) unabhängig von möglicherweise vorhandenen klonierungsrelevanten internen Schnittstellen transferiert werden können. Zwar sind Typ IIs-Restriktionsschnittstellen vergleichsweise selten, jedoch mussten im Falle der 21 *Cn*-Gene insgesamt sieben *Esp3I*- und eine *LguI*-Schnittstelle(n) via Mutation entfernt werden (Tabelle III.1). Die Fähigkeit zur simultanen Fusionierung beliebig vieler Fragmente/Gene in einer einzigen Reaktion ist sowohl dem in dieser Arbeit beschriebenen als auch dem SLIC-System gemeinsam. Beispielsweise wurden auch in dieser Arbeit im Falle von *hypX*, *hypF2* und *hypF3* je drei Genfragmente gleichzeitig fusioniert und in einen Akzeptorvektor transferiert. Die Planung derartiger Fusionierungen wird bereits über das Primer-Design bewerkstelligt ([376] und Abschnitt III.1.1). Lediglich ein Multigen-Expressionssystem, Acembl [384], bietet neben der in dieser Arbeit vorgestellten Plattform die Möglichkeit, Gene entweder als Polycistrons oder individuelle Transkriptionseinheiten zu assemblieren. Kein anderes System außer dem von uns vorgestellten erlaubt jedoch die Verteilung einzelner Multigen-Expressionsmodule auf verschiedene kompatible Vektoren. Die EMBL-Systeme beispielsweise erzeugen ein gemeinsames episomales DNS-Molekül (Fusionsplasmid), auf denen die assemblierten Gene/Genkassetten zusammen mit den über die Donorvektoren integrierten Resistenzgene und einem gemeinsamen Replikationsursprung kombiniert vorliegen [383-385]. Ein solches Assemblierungsprodukt würde die ausbalancierte Gendosis der SH- und M1-/M2-Module, welche in dieser Arbeit als Schlüssel zur Funktionalität der Reifungsmaschinerie und der SH angesehen werden kann, jedoch nicht ermöglichen. Gerade die durch kombinatorische Vektoren vorgegebenen Kopienzahlen in Verbindung mit der Anzahl der Genkassetten pro Konstrukt (ergo: die Gendosen) boten möglicherweise ein adäquates Expressionslevel zur funktionalen Synthese und Reifung des Zielenzyms. Darüber hinaus sei angemerkt, dass die induktiv entkoppelte Expression (Stämme SHdec1 und SHdec3; Tabelle III.6) mit T7- bzw. Tet-regulierten Modulen in einer Zelle in dieser Form mit keinem anderen bisher beschriebenen System möglich wäre.

IV.2 Die SH-Produktion in *Cupriavidus necator* kann systematisch beeinflusst werden.

Cupriavidus necator ist ein zu mixotrophem Stoffwechsel befähigter Organismus ([211] und Abschnitt I.3.1). Unter lithoautotrophen Bedingungen dient H₂ als einzige Energiequelle. Die

Derepression der H_2 -ase-Synthese ist in *Cn* jedoch nicht auf lithoautotrophe Bedingungen beschränkt [214,217]. Sind energiereiche Kohlenstoffquellen wie Pyruvat, Fruktose oder Succinat vorhanden, wächst der Organismus mit maximaler Wachstumsrate, während die Expression der Gene für den lithotropen Stoffwechsel reprimiert werden. Energiearme Substrate wie Glycerin hingegen verlangsamen das Wachstum, kombiniert mit einer Derepression der Synthese zentraler Enzyme für lithotropes Wachstum („Hydrogenase-dereprimierende Bedingungen“ [206,211,214,217]). Unter derartigen Bedingungen können sogar deutlich höhere SH- und MBH-Syntheseraten als bei Anwesenheit von H_2 beobachtet werden [203,256]. Dies wurde innerhalb dieser Arbeit zur Optimierung der SH-Produktion unter heterotrophen Bedingungen ausgenutzt (Abschnitt III.2.1). Da *Cn* der einzig bekannte aerobe H_2 -Oxidierer ist, dessen Synthese energieliefernder Hydrogenasen nicht strikt auf die Anwesenheit von H_2 angewiesen ist [131], soll der regulatorische Hintergrund – soweit bekannt – im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Transkription aller *Cn* Hydrogenase-Struktur-, Reifungs- und Regulationsgene erfolgt nach bisherigem Verständnis durch folgende Kontrolleinheiten: P_A ist ein Promotor stromaufwärts von *hoxA* (siehe MBH- und RH-Cluster in Abb. III.1). Dieser gewährleistet eine schwache konstitutive Produktion des zentralen Transkriptionsaktivators HoxA [216], welcher zusammen mit σ^{54} die Expression des vollständigen MBH- (P_{MBH}) bzw. SH-Operons (P_{SH}) reguliert (Abb. III.1) [133]. Unter dereprimierenden Bedingungen erfolgt eine Aktivierung von HoxA, welches in der Folge die Transkription ausgehend von P_{MBH} und P_{SH} initiiert [215]. Dies führt einerseits zur Synthese aller MBH-, SH- und RH-Struktur- und Hilfgene, andererseits auch zur verstärkten Expression des *hoxA*-Gens, welches innerhalb des MBH-Operons vorliegt. Dadurch wird eine positive Feedback-Schleife ausgelöst, da vermehrt gebildetes HoxA erneut die Kaskade initiiert. Die Faktoren, welche die zuvor genannte Derepression auslösen, sind die Präsenz von Wasserstoff (wobei die RH als H_2 -Sensor fungiert [131,132,230]), O_2 -Mangel, Ansäuerung/Alkalisierung des Mediums und energielimitierende Bedingungen [211]. Es wurde vermutet, dass *Cn* bei Wachstum mit Glycerin in eine Phase des zellulären Stresses gedrängt wird, was mit Ergebnissen von Proteomanalysen [211] und der Tatsache korreliert, dass die Wachstumsrate unter diesen Bedingungen stark verringert ist [219]. Während dieser Phase wird die Konzentration zentraler Signaltransduktions- und Regulationsfaktoren herunter reguliert, was in einer Abnahme von Aminosäure- und Ribosomensynthese-Enzymen sowie Enzymen des Transkriptionsapparats resultiert. Eine analoge Kaskade wird innerhalb der generellen Stressantwort in *E. coli* vermutet ([218] und Abschnitt IV.4). Die Bildung reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS) koinzidiert mit diesem Phänomen und verstärkt den oxidativen zellulären Stress. Während in *E. coli* ausschließlich die Flavoproteine der Atmungskette für die ROS-Bildung verantwortlich sind [386], trägt in *Cn* die Aktivität des Diaphorase-Moduls (HoxFU) der SH erheblich zur Anhebung der ROS-Konzentration bei und verstärkt damit autokatalytisch die Stressbedingungen der Zelle [247,298]. Auf den ersten Blick erscheint es paradox, dass *Cn* unter diesen Bedingungen die energieaufwändige Synthese von Enzymen des lithotropen Stoffwechsels betreibt, da dies in Abwesenheit von H_2 einem Netto-Energieverlust entspricht. Jedoch wird angenommen, dass sich der Organismus unter Stressbedingungen auf lithotrophe Bedingungen vorbereitet. Sowohl der H_2 -Sensor (RH) als auch die Hyp-Proteine wären somit, sobald diese Bedingungen vorlägen, unmittelbar verfügbar [215]. Innerhalb des natürlichen Habitats könnte gerade die Fähigkeit des direkten stoffwechselphysiologischen Umschaltens einen Selektionsvorteil darstellen.

Im Wissen um die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen und die auslösenden Faktoren nahmen wir innerhalb dieser Arbeit eine Reihe von Optimierungen der SH-Synthese bei Kultivierung im Schüttelkolben vor (Abb. III.9). Hierbei war die Modifikation und Auslotung aller Basis-Parameter vonnöten, da vergleichbare H_2 ase-Synthesestrategien in *Cn* auf der O_2 - und pH-regulierten Kultivierung im Fermenter basierten [203,256]. Der erste Optimierungsschritt beinhaltete den Wegfall des SL6-Spurenelementemixes und die Supplementation von $1\ \mu M$ $NiCl_2$. Bereits in einer Arbeit von Friedrich und Mitarbeitern wurde dieser Austausch als vorteilhaft für vermehrte Synthese der Hydrogenasen in *Cn* beschrieben [219]. Aufgrund des hochaffinen Nickel-Aufnahmesystems von *Cn* (HoxN1 [237,317,318]) darf die Konzentration von $1\ \mu M$ hierbei nicht überschritten werden [219]. Zusätzlich wurde die Verfügbarkeit der primären Stickstoffquelle (NH_4Cl) verdoppelt (Abb. III.9). Dieses Vorgehen begründet sich mit der Beobachtung, dass *Cn* unter Stickstoff-Limitierung und bei Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle vermehrt das Speicherprodukt Poly- β -Hydroxybuttersäure (PHB) synthetisiert [217], welches bis zu 80% des Zellfeuchtgewichts einnehmen kann und konkurrierende Synthesewege blockiert [387,388]. Weitere Erhöhungen der Stickstoffquelle verringerten jedoch die SH-Synthese (Daten nicht gezeigt). Bereits bei Kultivierung von *Cn* im Fermenter war festgestellt worden, dass Eisen im Überschuss zur Gewährleistung der effizienten SH-Produktion supplementiert werden muss [203]. Die Autoren nutzten jedoch $FeCl_3$, welches aufgrund der Bildung von nahezu unlöslichem $Fe(OH)_3$ ständig neu zudosiert werden muss. In dieser Arbeit wurde stattdessen Fe-Citrat zugesetzt und dieses im Vergleich zu einem ursprünglichen Rezept [389] zehnfach im Überschuss supplementiert. Dies führte zu einer weiteren Verdopplung der SH-Aktivität in

Extrakten (Abb. III.9). Der finale Optimierungsschritt maximierte die SH-Aktivität schließlich auf $12,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, der höchsten bislang erreichten SH-Aktivität in Extrakten. Innerhalb dieses letzten Schrittes wurde eine Trennung der beiden Wachstumsphasen vorgenommen: Anstelle des üblichen Vorgehens, bei welchem Fruktose und Glycerin bereits zu Beginn der Kultivierung zu gleichen Teilen zugesetzt werden, versorgten wir die Zellen in dieser Arbeit zunächst ausschließlich mit Fruktose als C-Quelle und kultivierten diese bei optimaler Temperatur und Schüttelrate bis zu Beginn der stationären Phase. Dieser Zeitpunkt war erfahrungsgemäß nach 24 Stunden erreicht. Anschließend verringerten wir die Schüttelrate, senkten die Kultivierungstemperatur auf Raumtemperatur und versetzten die Zellen mit Glycerin. Die Konzentration beider C-Quellen entsprach insgesamt der doppelten üblicherweise zugegebenen Menge (je 0,4% (w/v) Fruktose in Phase I bzw. Glycerin in Phase II). Maximale SH-Aktivitäten konnten 72 Stunden nach Kultivierungsstart (48 Stunden in Phase II) gemessen werden. Es kann vermutet werden, dass die kurze Periode vollständigen Mangels einer C-Quelle (Ende von Phase I), kombiniert mit den zusätzlichen Stressbedingungen durch Absenken der Temperatur und der O₂-Versorgung, die Bedingungen für Synthese der Hydrogenasen weiter optimierte. Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung der *Cn* Hydrogenasen für den Organismus, da dieser offenbar gezwungen werden kann, substantielle Energiereserven für den Fall einer spontanen Verknappung heterotropher C-Quellen in die Synthese transient wirkungsloser Enzyme abzuzweigen.

IV.3 *Escherichia coli* als Produktionsplattform für [NiFe]-Hydrogenasen

Escherichia coli ist ein biotechnologischer Modellorganismus, welcher neben der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* maßgeblich für Vorhaben der synthetischen Biologie und des *Metabolic engineering* eingesetzt wird [372]. Während innerhalb dieser Bereiche oftmals die Biosynthese von Medikamenten oder energiereichen niedermolekularen Substanzen angestrebt wird, dient *E. coli* darüber hinaus als attraktives System zur klassischen Produktion rekombinanter Proteine. Enzyme oder Enzymkomplexe, welche durch aufwendige posttranslationale Reifungswege in ihre aktive Form überführt werden müssen, stellen vergleichbare Herausforderungen an die moderne Gentechnik wie die Knüpfung neuer regulatorischer Netzwerke im Rahmen des *Metabolic engineering*. In beiden Fällen konnten die maßgeblichen Pionierarbeiten erst nach der Jahrtausendwende vollendet werden, da derartige Arbeiten stark mit dem Fortschritt der „omics“ und der folglich zur Verfügung stehenden genetischen und biochemischen Information verknüpft sind [370,372]. Die Attraktivität der Möglichkeit, rekombinante [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli* produzieren zu

können, wurde bereits in Abschnitt I.4 erläutert. Im Folgenden sollen diejenigen Arbeiten vorgestellt werden, in welchen dies erfolgreich bewerkstelligt wurde.

Aus den eingangs der Diskussion kurz dargelegten Gründen war es bisher mit Ausnahme weniger Arbeiten nicht möglich, H₂ase-Module erfolgreich in heterologe Systeme zu transferieren [279,280]. Der erste beschriebene Versuch, welcher in einer geringen messbaren Aktivität des rekombinanten Enzyms resultierte, war der Transfer der Strukturgene für die HynAB aus *Desulfovibrio gigas* in *Desulfovibrio fructosovorans* MR400 [284]. Es folgten weitere Arbeiten, welche den Transfer lediglich der Strukturgene eines Enzyms unter Ausnutzung des endogenen Reifungsapparats nah verwandter Empfängerorganismen dokumentierten. Die Zielgene stammten hierbei aus *Clostridium pasteurianum*, verschiedenen Rhizobien oder *Cupriavidus necator* und wurden in *Synechococcus* sp. PCC7942 [390], *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 [391] bzw. *Rhodococcus opacus* [283] und *Pseudomonas stutzeri* [282] heterolog exprimiert. Die Cn RH wurde schließlich als erste [NiFe]-Hydrogenase erfolgreich in *E. coli* produziert ([185] und Tabelle IV.1). Die Reifung der RH beinhaltet jedoch keinen spezifischen C-terminalen Verkürzungsschritt, so dass das Hyp-Basisgerüst für die funktionale Kofaktor-Assemblierung ausreicht. Zudem war die RH-Synthese auf strikt anaerobe Bedingungen und die Aktivität des endogenen HypF Proteins aus *E. coli* angewiesen [185]. Adams und Mitarbeiter nutzten im Jahre 2010 erstmals eine modulare Expressionsplattform zur Produktion der SHI aus *Pyrococcus furiosus* (Pf) in *E. coli* [286]. Hierbei kam eine Kombination des Gateway[®]- und des Duet[™]-Systems zum Einsatz und die Produktion erfolgte unter Anaerobiose. Für das Erreichen der maximalen Aktivität musste letztendlich jedoch lediglich die C-terminale Endopeptidase aus Pf zusammen mit den Strukturgenen koexprimiert werden (Tabelle IV.1). Weitere erfolgreiche, jedoch mit äußerst geringen ZFE-Aktivitäten einhergehende Versuche erfolgten durch Transfer sowohl der Reifungs- als auch Strukturgene aus *Synechocystis* sp. PCC6803 [287], *Alteromonas macleodii* und *Thiocapsa reseopersicina* [288] in *E. coli* (Tabelle IV.1).

Wir stellen innerhalb dieser Arbeit schließlich erstmals ein System vor, mit dem spezifische Extraktaktivitäten in der Größenordnung des Wirtsorganismus erreicht werden können (Abschnitt III.2.2 und Tabelle IV.1). Gleichzeitig stellt es die erste Strategie zur Produktion einer rekombinanten [NiFe]-Hydrogenase dar, welche nicht auf strikt anaerobe Bedingungen angewiesen ist (Abschnitt IV.4). Während in den meisten Fällen lediglich die erfolgreiche Reifung einer heterolog produzierten Hydrogenase vorgestellt wurde und eine anschließende Isolierung ausblieb, beschreiben die Arbeiten von Lenz *et al.* [185] sowie Sun *et al.* [286] jeweils erfolgreiche Reinigungen der rekombinanten Enzyme aus *E. coli*. Eine tatsächliche

Aktivität wurde jedoch nur im Falle der SHI aus *Pf* dokumentiert und entsprach mit $100 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ dem Wert, welcher bei Isolierung des Enzyms aus *Pf* erreicht wurde. Die volumetrische Ausbeute lag hierbei, soweit sie angegeben wurde, eine [185] bzw. zwei bis drei [286] Größenordnungen unter der in dieser Arbeit erreichten (Tabelle IV.1).

Tabelle IV.1 – Vgl. bisheriger Arbeiten zur Produktion rekombinanter [NiFe]-Hydrogenasen in *E. coli*.

H ₂ ase (aus)	Reifungsapparat	Organisation	ZFE Aktivität [U·mg ⁻¹]	Aktivität gereinigtes Enzym [U·mg ⁻¹]	Ausbeute	Ref.
<i>Cupriavidus necator</i> H16						
RH (StrepII-HoxB/HoxC)	<i>hypA1B1C1D1E1</i> aus Cn ; <i>hypF</i> endogen	1 Plasmid	nicht bestimmt	nicht bestimmt	0,2-0,33 mg·(L Kultur) ⁻¹	[185]
<i>Pyrococcus furiosus</i>						
SHI (PF0891-PF0894)	<i>frxA</i> aus Pf ; <i>hypABCDEF</i> & <i>slyD</i> endogen	2 Plasmide (maximal 4 Plasmide)	0,03 (2,9 nach Hitzeschritt)	100	n. b., im µg-Bereich pro L Kultur	[286]
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803						
SynHox (hoxFUYHE)	<i>hypABCDEF</i> & <i>hoxW</i> aus Syn	1 Plasmid	0,037	nicht gereinigt	nicht gereinigt	[287]
<i>Alteromonas macleodii</i> Deep Ecotype (DE)						
AltDE-Hyn (HynSL)	<i>cyt</i> , <i>orf2</i> , <i>hynD</i> , <i>hupH</i> & <i>hypABCDEF</i> aus Am	1 oder 2 Plasmide	$7 \cdot 10^{-4}$	nicht gereinigt	nicht gereinigt	[288]
<i>Thiocapsa reseopersicina</i>						
TrHyn (HynSL)	<i>hynD</i> , <i>hupK</i> & <i>hypC1D1</i> aus Tr ; <i>cyt</i> , <i>orf2</i> , <i>hynD</i> , <i>hupH</i> & <i>hypABCDEF</i> aus Am	2 Plasmide	$7 \cdot 10^{-5}$	nicht gereinigt	nicht gereinigt	[288]
<i>Hydrogenovibrio marinus</i>						
HmHyd (HydSL)	vollständig endogen	1 Plasmid	0,021	nicht gereinigt	nicht gereinigt	[322]
<i>Cupriavidus necator</i> H16						
SH _{V1} (HoxF-StrepII/HoxUYH)	<i>hypA2B2C1D1E1F2X</i> , <i>hoxW</i> & <i>hoxN1</i> aus Cn	2 Plasmide	6,8	192	1,1 (7,4)^a mg·(L Kultur) ⁻¹	diese Arbeit
SH _{V2} (HoxI-StrepII/HoxFUYH)	<i>hypA2B2C1D1E1F2X</i> , <i>hoxW</i> & <i>hoxN1</i> aus Cn	2 Plasmide	3,8	227	4,4 (14,1)^a mg·(L Kultur) ⁻¹	

^aDie Werte in Klammern beziehen sich auf theoretische Maximalwerte, basierend auf dem Vergleich der ZFE-Aktivität bei den Reinigungen mit der jeweils maximal erreichten ZFE-Aktivität des Stammes (Tabelle III.6).

IV.4 SH-Produktion & Reifung in *E. coli*: komplexe Einflüsse endo- und exogener Faktoren

Eine der zentralen Herausforderungen bei Expression der *Cn* Gene stellte die Löslichkeit der Genprodukte dar. Die entwickelte Expressionsplattform gewährleistete aufgrund der Möglichkeit, Gene als individuelle Transkriptionseinheiten exprimieren zu können, die Produktion großer Mengen aller rekombinanter Genprodukte (Abschnitt IV.1). Dies

resultierte jedoch zwangsläufig in der Notwendigkeit, Expressionsraten einzudämmen und einer Feinabstimmung mit der Medienzusammensetzung sowie den Wachstumsparametern und –phasen zu unterziehen. Gleichzeitig ist nicht nur die Quantität löslicher Hilfs- und Strukturproteine, sondern vor allem ihre Funktionalität von herausragender Bedeutung. Die Löslichkeit und Funktionalität interagierender Proteine bedingen sich üblicherweise in gewissem Maße gegenseitig. Beispielsweise ist es vielfach gelungen, durch Koexpression eines physiologischen Komplex-Partners die Löslichkeit eines Genprodukts substantiell zu erhöhen oder diese überhaupt zu ermöglichen [379,392-394]. Zum einen sind Komplexgebundene Proteine besser vor proteolytischer Degradation geschützt [367,392,395]. Hinzu kommt jedoch die Eigenschaft mancher Proteine, in ihrer nicht assemblierten bzw. Kofaktorfreien Form aufgrund vergrößerter hydrophober Kontaktflächen zur Aggregation zu neigen. Daher bietet sich in diesen Fällen oftmals die Koexpression geeigneter Chaperone als Lösungsansatz an [396]. Im Falle der bei individueller Expression teilweise nahezu unlöslichen SH-Untereinheiten konnte dies durch die Koexpression des funktionalen Reifungsapparats, d. h. den Chaperonen der SH, erfolgreich bewerkstelligt werden. Als überraschend stellte sich jedoch heraus, dass sich die Enzym-Untereinheiten in Abwesenheit der M1- oder M2-Gene, sofern alle vier bzw. fünf SH-Gene koexprimiert wurden, als partiell löslich erwiesen (Abb. III.33). Obwohl eine genaue Untersuchung dieses Phänomens noch aussteht, war aus zellfreien Maturationsversuchen (ZFM) ersichtlich, dass für eine Komplexbildung der Hox-Proteine keine C-terminale Verkürzung der Hydrogenase-Untereinheit stattgefunden haben muss. Dies konnte durch Koelution aller SH-Untereinheiten (inkl. Apo-HoxH; Abb. I.4) aus einer Δ M1-Umgebung demonstriert werden (Abb. III.33).

Die Lösung für oben genannte „Feinabstimmung“ wurde durch eine Strategie geliefert, welche von Studier im Jahre 2005 unter der Bezeichnung „Autoinduktion“ eingeführt wurde [321]. Hierbei kommt Laktose anstelle von IPTG als Induktor des lacUV5/T7-Promotors zum Einsatz. Dieser Austausch hatte in entsprechenden Versuchen zur SH-Produktion zunächst keinerlei Abschwächung der Expressionsrate zur Folge (Abb. III.10, Tabelle III.5). Jedoch ermöglichte diese Strategie die Manipulation zahlreicher zusätzlicher Stellschrauben, mithilfe derer Optimierungen hinsichtlich der Expressionsstärke und –dauer vorgenommen werden konnten (Abb. III.11). Anhand der innerhalb dieses Abschnitts *vide infra* vorgestellten Diskussion soll darüber hinaus folgendes verdeutlicht werden: Die hohen Zelldichten, welche durch das Glucose/Glycerin/Laktose-System und die verlängerte Kultivierungsdauer ermöglicht wurden, boten offenbar hinsichtlich des zellulären Redoxpotentials ein optimales Milieu für den Reifungsapparat der SH. Die Promotorwahl in Kombination mit der

zugehörigen Expressionsstrategie bildeten folglich eine essentielle Basis für die erfolgreiche (prinzipiell) aerob geführte Produktion und Reifung der SH in *E. coli* BL21Star™ (DE3).

Bereits in Abschnitt IV.1 wurde erläutert, dass die Vektorkombinatorik und Verteilung von SH- und M1/M2-Genkassetten auf Plasmide mit unterschiedlicher Kopienzahl die Möglichkeit bot, mithilfe der molekularbiologischen Plattform Optimierungen vorzunehmen. Die Kombination der pE- und pS-Konstrukte erwies sich hierbei als optimal (Tabelle III.6). Dies könnte einerseits mit einer daraus resultierenden adäquaten Dosis der SH- und M1/M2-Module begründet werden. Andererseits ist anzumerken, dass die verringerte Aktivität der Stämme mit pAmp.RSF.3a-Konstrukten verschiedene Gründe haben könnte. Zum einen liegen RSF-Konstrukte in sehr hohen Kopienzahlen in der Zelle vor (>100 [369]), wodurch selbst im Falle nicht toxischer Genprodukte ein enormer Selektionsdruck in Richtung des Plasmidverlusts resultiert [321]. Gleichzeitig könnte die Erhöhung der Gendosis unweigerlich zu den zuvor durch die Kultivierungsstrategie bewältigten Löslichkeitsproblemen geführt haben. Andererseits werden pAmp.RSF.3a-Transformanten auf Amp/Carb selektiert, welches verglichen mit Kanamycin und Spectinomycin eine verringerte Langzeitstabilität in wässrigen Medien aufweist [320]. All dies sind denkbare Gründe, warum die Strategie der induktiven Entkopplung, bei welcher pASG-Konstrukte (Amp^R; ColE1 ori) für die Tet-regulierte Expression der SH-Gene eingesetzt wurden, nicht in höheren spezifischen Aktivitäten resultierte („SHdec“ Stämme; Tabelle III.6).

Die Expressions- und Kultivierungsbedingungen wurden sequentiell modifiziert, um eine systematische Optimierung der SH-Ausbeute vorzunehmen. Im Falle der physikalischen Parameter schloss dies die Kultivierungstemperatur und -zeit, die Schüttelrate und das Arbeitsvolumen ein. Die ideale Kultivierungstemperatur in Bezug auf maximale SH-Aktivität in Extrakten lag zwischen 22 und 25 °C (Raumtemperatur, RT), während höhere Temperaturen substantielle Aktivitätsverringerungen zur Folge hatten (Abb. III.11f). Es ist bekannt, dass die Absenkung der Temperatur oftmals in Fällen wirksam ist, wo rekombinante Proteine zur Aggregation neigen [397-402]. Aufgrund der verringerten Expressionsrate bei niedrigerer Temperatur ist die Faltungsmaschinerie der Zelle üblicherweise besser in der Lage, Protein-Aggregationen entgegen zu wirken [403]. Dieser Zusammenhang scheint auch in diesem Falle auf die Proteinsynthese selbst beschränkt zu sein, da das optimale Aktivitätsfenster des M1-Reifungssatzes innerhalb der ZFM-Experimente bei 30 °C ermittelt wurde und die Maturasen selbst bei 37 °C *in vitro* noch über 20% ihrer maximalen Aktivität aufweisen (Abb. III.30c). In kausalem Zusammenhang mit der gewählten Temperatur stand die Kultivierungsdauer, welche äußerst exakt an die übrigen Parameter angepasst werden

musste. Ansätze zur Analyse der in Abb. III.13 dargestellten Wachstumskurve sind innerhalb eines Teilabschnitts *vide infra* gegeben. Füllvolumen und Schüttelrate fungierten im Schüttelkolben als Stellschrauben für die Sauerstoffversorgung, welche innerhalb des geschüttelten Systems eine schwer zu erfassende Größe darstellt. Zweifellos fluktuiert der Sauerstoffgehalt des Mediums und der Zellen in Abhängigkeit der Zelldichte und damit der Kultivierungsdauer, was in Anbetracht des Zeitraums optimaler Reifung (Abb. III.13a) als ein essentieller Zusammenhang angesehen werden kann (siehe unten).

Die Technik der Autoinduktion setzt eine Feinabstimmung der Medienzusammensetzung in einem spezifischen Expressionsversuch voraus [321,404]. Dies muss unter Berücksichtigung aller physikalischen Parameter erfolgen. Beispielsweise verschiebt sich die Phase des Laktose-Katabolismus in Abhängigkeit der O₂-Verfügbarkeit, was sich wiederum auf die Glycerin-Umsetzung vor oder nach der Laktose-Phase auswirkt. Bei ausreichender Begasung innerhalb der Glucose-Phase wird im Anschluss zunächst Glycerin und erst dann Laktose sequentiell umgesetzt [404]. Innerhalb dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene Medien als Basis für SH-Produktion getestet. Hierbei ergab die Kultivierung in M9-Minimalmedium die höchste SH-Ausbeute, während unter den Komplexmedien lediglich HEM-⁵, nicht jedoch LB- und TB-Medium zu vergleichbaren Aktivitäten führten (Abb. III.11a). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Komplexmedien aufgrund starker Basalexpression zu Beginn der Kultivierung im Falle der Autoinduktion eher nachteilig sind [405]. Überdies ist ein genereller Nährstoffüberschuss – wie innerhalb des Komplexmediums vorhanden – aus zwei Gründen nicht immer vorteilhaft: Zum einen wurden Fälle beobachtet, in denen im Überschuss vorhandene Aminosäuren die Laktose-Induktion inhibieren [321]. Die genauen Gründe sind hierbei bislang unbekannt. Zum anderen sind gerade die in dieser Arbeit vorgestellten Optimierungsschritte mit der genauen Kontrolle der Medienbestandteile verbunden, was den Einsatz definierter oder semi-definierter Medien bedingt (Abb. III.11d).

Die Autoinduktionstechnik setzt ein festgelegtes Verhältnis der drei Kohlenstoff-Quellen im Medium voraus. Allerdings konnte in dieser Arbeit diesbezüglich nur bedingt auf frühere Studien zurückgegriffen werden, da dort meist nur die Produktion *eines* Zielproteins angestrebt wurde. Die Synthese multipler Gene kann nur in Abstimmung mit der spezifischen Löslichkeitsbalance und Funktionalität resultierender Genprodukte optimiert werden, was maßgeschneiderte Lösungen für den einzelnen Anwendungsfall erfordert ([321,404,406] und diese Arbeit). Die Laktose-Konzentration für optimale SH-Produktion lag in Kombination mit definierten Glucose- und Glycerin-Konzentrationen [0,1% (w/v) bzw. 2% (v/v)] bei 0,8%

⁵ HEM (*H*ydrogenase-*e*xpression *m*odified) Medium entspricht einem semi-definierten Medium, welches von einer anaeroben H₂ase-Produktionsstudie [287] adaptiert wurde. Das Rezept findet sich in Abschnitt II.1.5.1.

(w/v) (Abb. III.11b). Im Normalfall führen derart hohe Konzentrationen zum Zeitpunkt der Derepression zu einer Überlastung der Zellen und dadurch oftmals zu einem Plasmidverlust, so dass die Produktausbeute bei Zellernte stark verringert ist [321]. Dies zeigt, dass rekombinante Stämme durchaus höhere Induktorkonzentrationen tolerieren, wenn nicht nur die Expression von *einem* Gen, sondern von 13–21 heterologen Genen angeregt wird und die Gendosis einen potentiellen Maximalwert nicht überschreitet. Dennoch kann eine derartige Aussage nur unter dem Vorbehalt getätigt werden, dass hier lediglich endgültige Resultate (Ausbeute funktional assemblierter SH), nicht jedoch Stoffflüsse beleuchtet wurden.

Abb. III.13 zeigt exemplarisch für den Stamm K1A die Wachstumskurve bei Kultivierung im Fermenter unter Einsatz des in dieser Arbeit optimierten Induktions-/Expressionsmediums. Der Wachstumsverlauf zeigt vor Erreichen der stationären Phase drei Wachstumsintervalle, welche durch Verzögerungsphasen unterbrochen werden (Phasen I–VI; Abb. III.13a). Die Wachstumskurve ähnelt damit formal einem doppelten Diauxie-Verhalten („Triauxie“), welches jedoch aufgrund fehlender Daten über den Verlauf der Substratverwertung auf Regulationsebene nicht gesichert angenommen werden kann. Obwohl ähnliche Verläufe im Schüttelkolben beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt), muss der innerhalb dieses Abschnittes geschlussfolgerte Ablauf aufgrund der unterschiedlichen Begasungsstrategien (bei Vergleich der beiden Kultivierungssysteme) nicht zwangsläufig übereinstimmen. Im Zuge der Hochskalierung des Prozesses auf den Fermenter-Maßstab konnte jedoch das resultierende SH-Aktivitätsoptimum innerhalb desselben Zeitfensters beobachtet werden. Bei Kultivierung im Fermenter konnten zum Zeitpunkt der Zellernte hinsichtlich optischer Dichte, Zellausbeute (Feuchtgewicht) und SH-Aktivität vergleichbare Resultate (Werte innerhalb $\pm 20\%$ ⁶) wie im Schüttelkolben erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund kann die dargestellte Wachstumskurve für eine Analyse des generellen SH-Produktionsprozesses herangezogen werden.

Phase I repräsentiert die erste exponentielle Wachstumsphase. Gemäß einem gut untersuchten Katabolit-Repressions-System hat die Umsetzung von Glucose in *E. coli* stets Vorrang [407,408]. Die Menge zugesetzter Glucose (0,1% w/v) allein kann jedoch nicht die benötigte Menge Kohlenstoff für das Erreichen der am Ende von Phase I beobachteten $OD_{600} \approx 4$ liefern (Abb. III.13a; Start- $OD_{600} = 0.1$). Innerhalb von Phase I kann folglich bereits ein fließender Übergang zu der Umsetzung von Glycerin oder Laktose angenommen werden. Mehrere Faktoren sprechen hierbei für eine Glycerin-Umsetzung mit zunächst vollständiger

⁶ Für den Vergleich der Fermenter- und Schüttelkolben-Kultivierung wurden mindestens drei unabhängige Experimente in den jeweiligen Maßstäben vorgenommen.

Repression der Laktose-Aufnahme: Blommel *et al.* zeigten, dass der Glycerin-Katabolismus der Laktose-Umsetzung stets vorgeschaltet ist, solange keine O₂-Limitierung vorliegt [404]. Überdies wurde die Vorkultur, welche auf Glucose und Glycerin, nicht jedoch Laktose angezogen wurde, innerhalb der exponentiellen Phase überimpft. Es kann daher angenommen werden, dass die Zellen wahrscheinlich bereits partiell auf einen Glycerin-Katabolismus adaptiert waren. Gleichzeitig lässt sich eine vollständige Derepression des lacUV5-Promotors anhand der deutlichen Bildung rekombinanter Genprodukte erst im Anschluss an Phase II verorten (Abb. III.13b). Demnach wäre es denkbar, dass mit Beginn von Phase II die Laktose-Aufnahme stattfindet. Der hierbei beobachtete kurzzeitige Rückgang der Atmungsaktivität und die Stagnation des Wachstums entsprechen auf Regulationsebene dem Diauxie-Verhalten [409] (Abb. III.13a). Eine Voraussetzung für die hier vorgestellten Überlegungen wäre dementsprechend, dass dem Übergang von Glycerin- zu Laktose-Umsetzung (Phase II) wie im Falle der Glucose- zu Laktose-Umstellung ein adaptiver Vorgang zugrunde liegt. Tatsächlich wurde auch für Glycerin eine vom Phosphotransferasesystem (PTS) unabhängige Katabolit-Repression in *E. coli* beschrieben [410]. Als weiterer Faktor für die dramatische Verlangsamung des Wachstums in Phase II käme jedoch die Produktion der rekombinanten Genprodukte in Betracht (Abb. III.13b). Diese werden offenbar innerhalb des vergleichsweise kurzen Zeitraums der Laktose-Aufnahme und -Umsetzung (Phasen II–III) gebildet und liegen anschließend stabil in nahezu unveränderten Mengen vor (Abb. III.13b). Eine „Aktivierung“ der Reifungsmaschinerie, welche schließlich den dramatischen Anstieg der SH-Aktivität zur Folge hat, erfolgt jedoch offenbar erst ab Phase V.

Aufgrund der Genanzahl und dem für deren Expression benötigten Energieaufwand wäre demnach ein vollständiger Verbrauch von Glucose, Glycerin und Laktose zu Beginn von Phase IV denkbar. Dies erklärt die zu diesem Zeitpunkt beobachtete Wachstumsstagnation und den erneuten kurzzeitigen Anstieg der Gelöst-O₂-Konzentration. Der Grund, warum in der Folge eine weitere Wachstumsphase (Phase V; Abb. III.13a) beobachtet werden konnte, bleibt spekulativ. Hierbei muss eine weitere Beobachtung, welche nicht Teil der Abbildung ist, mit einbezogen werden: Von Phase I–III konnte eine Zudosierung von Base (NaOH) durch die pH-Regeleinheit des Fermenters beobachtet werden, während ab Phase IV eine Säure-Titrierung (H₃PO₄) stattfand (Daten nicht gezeigt). Es kann daher angenommen werden, dass das in Phase V beobachtete Wachstum mit einer Umsetzung der zuvor fermentativ gebildeten Säuren einherging. Acetat beispielsweise fällt bei aerober Kultivierung von *E. coli* hauptsächlich im Rahmen der Umsetzung von Glucose an, da der Organismus selbst bei maximaler O₂-Verfügbarkeit nur eine begrenzte Kapazität für die vollständige

Oxidation von Acetyl-CoA besitzt („*Overflow*“; [411-415]). Eine anschließende Wiederaufnahme und Umsetzung von Acetat ist in diesem Zusammenhang ein gut beschriebenes Phänomen [416]. Acetat-Verwertung in *E. coli* erfolgt ausschließlich unter aeroben Bedingungen [417,418]. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung eines rapiden Verbrauchs von Gelöst-Sauerstoff ab Phase IV (Abb. III.13a). Unter aeroben Bedingungen stellt Acetat das hauptsächliche Nebenprodukt des Glucose-Überflussmetabolismus in *E. coli* dar [419]. Als weitere Carbonsäure käme zumindest bei Berücksichtigung der hohen Glycerin-Konzentrationen (2% v/v) zu Beginn der Kultivierung Succinat in Betracht. Hierbei müsste vorausgesetzt werden, dass auch der Glycerin-Katabolismus ein „*Overflow*“-Phänomen hervorruft. Es wurde gezeigt, dass auch Glycerin u. a. von *E. coli* B-Stämmen in Abwesenheit eines terminalen Akzeptors fermentiert werden kann [420]. Da Glycerin stärker reduziert ist als Glucose, kann die Redoxbalance hierbei nicht durch Bildung von Acetat ausgeglichen werden. Ethanol und/oder Succinat werden gebildet. Das zur Succinat-Bildung benötigte CO₂ stammt unter anaeroben Bedingungen aus der Aktivität des FHL-Komplexes [420], wäre im Rahmen des hier postulierten „*Overflow*“-Metabolismus hingegen ohnehin aufgrund der parallelen Aktivität des Tricarbonsäure-Zyklus während Phase I verfügbar. Ein Szenario, in welchem das Wachstum in Phase V von Succinat oder Acetat/Succinat bestimmt wird, könnte einen Ansatz für die dort beobachtete rapide Zunahme der SH-Aktivität liefern (Abb. III.13a). Bereits für die Reinigung der SH wurde demonstriert, dass Succinat-Zugabe aufgrund des dadurch resultierenden hohen mittleren Redoxpotentials ($E^{0'} = 0,03 \text{ V}$ für Succinat/Fumarat, sowie Verbrauch restlichen Sauerstoffs) einen stabilisierenden Effekt auf das Enzym auswirkt ([203] und Abschnitt IV.5).

Bei Berücksichtigung der derzeitigen Datenlage sind die bisher hinsichtlich des Kultivierungsprozesses formulierten Überlegungen rein spekulativ. Daher wird es in künftigen Experimenten vonnöten sein, Substrat- und Produktkonzentrationen zu erfassen und mit den bisher vorgestellten Daten abzugleichen. Auf diese Weise würde das Verständnis des Reifungsprozesses *in vivo* erweitert, was sowohl grundlagenorientiert als auch hinsichtlich einer Optimierung des SH-Produktionsprozesses von Interesse wäre. Mögliche Regulationsmechanismen und Stressreaktionen von *E. coli*, welche in Phase VI (stationäre Phase) von Bedeutung sein könnten, werden innerhalb des folgenden Teilabschnitts beleuchtet. Ein besonderes Interesse galt dieser Phase, da die SH-Aktivität dort ihr Maximum erreichte, anschließend jedoch rasch wieder absank (Abb. III.13a). Daher war der Zeitraum der Zellernte von besonderer Bedeutung.

Escherichia coli reagiert auf verschiedene Umwelteinflüsse wie steigende oder fallende Temperaturen, verringertes Nährstoffangebot oder osmotischen Schock mit einer Reihe von Stressantworten, welche unter anderem durch die sogenannten Sigma-Faktoren auf Transkriptionsebene reguliert werden [403]. Die Faktoren σ^{32} (RpoH) und σ^E (RpoE⁷) lösen die Hitzeschock-Antwort bei hohen (σ^{32}) bzw. sehr hohen Temperaturen >42 °C (σ^E) aus. Das andere Extrem, der Kälteschock, induziert die Bildung einer Reihe spezifischer Regulatoren (z. B. Csp-Familie), ist jedoch erst bei Temperaturen deutlich unter 20 °C relevant und damit nicht Teil dieser Diskussion. σ^{54} (RpoN) ist als Transkriptionsregulator bei Stickstoff-Mangel bekannt, reguliert darüber hinaus jedoch meist zahlreiche für den anaeroben Stoffwechsel relevante Gene sowie die Expression von Hydrogenase-Strukturgenen [421]. Ein Beispiel hierfür wurde bereits in Abschnitt IV.2 anhand der σ^{54} -regulierten SH-, MBH- und RH-Expression in *Cupriavidus necator* gegeben. Bei Aminosäure-, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatmangel oder bei limitierter Verfügbarkeit terminaler Akzeptoren werden in *E. coli* eine Reihe sich wechselseitig regulierender und ineinander greifender Stressantworten ausgelöst. Die stringente Antwort beispielsweise beinhaltet die Synthese eines zentralen pleiotropen Mediators (p)ppGpp durch RelA (bei Aminosäure-Mangel) oder SpoT (bei C-, N- oder P-Mangel, oxidativem Stress oder Verlangsamung der Wachstumsrate). σ^S (RpoS), Regulator der generellen Stressantwort, wird unter diesen Bedingungen ebenfalls als Resultat der (p)ppGpp-Induktion gebildet [218]. Ebenso wie im Falle einer Feinabstimmung des zellulären Metabolismus in Abhängigkeit der O₂-Konzentration ist *E. coli* auch in generellen Stresssituationen in der Lage, durch ein dynamisches Zusammenspiel der σ -Faktoren ein optimales Energiemanagement zu betreiben [403]. Die Rollen der Hitzeschock-Faktoren sind dabei keineswegs nur der Temperaturregulation unterworfen. Beispielsweise reguliert σ^{32} mit Ausnahme des Trigger-Faktors alle wichtigen cytosolischen Chaperone und ist damit z. B. bei Überproduktion rekombinanter Proteine, oxidativem Stress und innerhalb der stationären Phase, wenn die Zelle einen erhöhten Umwandlungs-Stoffwechsel (*turnover*) betreibt, von essentieller Bedeutung. Die stringente Antwort greift meist zur selben Zeit und induziert eine „Ablösung“ des Haushalts-Faktors σ^{70} , wodurch die Aminosäure-, Ribosomen-, rRNS- und tRNS-Synthese dramatisch herunter reguliert und der Zellzyklus eingefroren wird.

Die Induktion der heterologen Genexpression unter derartigen Bedingungen erscheint wenig vorteilhaft, wenngleich rekombinante Proteinproduktion in der stationären Phase bereits demonstriert wurde [422]. Relevant für den SH-Produktionsprozess war die Beobachtung, dass die *in-vivo*-Reifung des Enzyms ab Phase V mit deutlich erhöhter Rate erfolgte (Abb.

⁷ Das „E“ innerhalb σ^E bzw. RpoE steht für „Envelope Stress“ und bezieht sich auf die zelluläre Reaktion auf stark erhöhte Temperaturen zum Schutz der äußeren Zellmembran.

III.13a). Die Genprodukte hingegen waren bereits deutlich *vor* dieser Phase vorhanden (Abb. III.13b). Hier kann eine gewisse Parallele zu den Bedingungen gezogen werden, unter welchen die maximale SH-Produktion in *Cn* stattfindet (Abschnitt IV.2). Der Reifungsprozess in *Cn* scheint redoxabhängig zu sein, was durch die Beobachtung untermauert wird, dass *in-vitro*-Ansätze erhöhte Aktivitäten bei DTT-Zugabe zeigten (Abb. III.30a). Als zentral kann hierbei der Eisen-Stoffwechsel angesehen werden, sowohl im Hinblick auf die FeS-Cluster-Synthese als auch die Fe-Ligandierung im Zuge des Reifungsprozesses. Hierbei ist möglicherweise der von HypD, einem FeS-Protein, katalysierte Elektronentransfer von zentraler Bedeutung [179,181,182]. Es ist beispielsweise auffällig, dass der signifikante SH-Aktivitätsanstieg unmittelbar mit der deutlichen Verringerung der O₂-Konzentration im Medium einherging (Abb. III.13a). Anaerobiose stellte sich im Falle des *E. coli* HypD-Proteins als essentiell für die Funktionalität im zellfreien Reifungssystem heraus [346]. ZFM-Experimente in dieser Arbeit zeigten hingegen, dass im Falle der *Cn*-Hyp-Maschinerie milde Reduktionsbedingungen (DTT) selbst in Anwesenheit von O₂ ausreichend waren (Abb. III.30a). Es wäre möglich, dass dies *in vivo* den ab Phase V beobachteten O₂-limitierten Bedingungen entspricht.

Eine Reihe von Stressantworten können – mit Ausnahme von Phase I – für alle Phasen der Expressionskultivierung des Stammes „K1A“ angenommen werden, da das Wachstum in Minimalmedium kombiniert mit der Überproduktion rekombinanter Proteine zu einer starken Belastung des zellulären Energiemanagements führen [321,403]. In den meisten Fällen rekombinanter Enzymproduktionen wird die Vermeidung derartiger Bedingungen angestrebt, da die Zelle einen Großteil ihres Proteoms durch erhöhte Proteolyseaktivität zu reduzieren versucht. Dies erfolgt zwangsläufig auf Kosten der Ausbeute der meisten Zielproteine. Ein Szenario innerhalb dieser späten Phasen der Wachstumskurve, in welchem die Zielkomponente sich dennoch anreichert oder deren Konzentration unverändert bleibt, würde unweigerlich bedeuten, dass die rekombinanten Enzyme weniger stark der stressinduzierten Proteolyse zum Opfer fallen als die endogenen Proteine. Im Falle der Hyp-Proteine wäre es daher möglich, dass Komplexbildungen sowie die Ausbildung oligomerer nativer Formen die Stabilität gegenüber Proteolyse oder Aggregation erhöht (Abschnitt IV.7). Gleiches kann für die SH-Untereinheiten angenommen werden: Während weder StrepII-HoxF noch StrepII-HoxUF (Diaphorase-Dimer) individuell in löslicher Form produziert werden konnten, war es möglich, einen vollständigen HoxYHUF-Komplex (mit StrepII-HoxF) zu isolieren (Abb. III.33). Dies ist eine überraschende Beobachtung, da in diesem Falle keinerlei *Cn* Reifungsgene koexprimiert wurden. Hierbei könnte es sich um ein für die rekombinante *in-*

vivo-Reifung essentielles Phänomen handeln, welches eine cytosolische „Konservierung“ der Untereinheiten bis zum Erreichen des Hyp-Aktivitätsmaximums erlauben würde. Auch für StrepII-HoxW und weitere isolierbare und lösliche Hyp-Proteine konnte die Ausbildung oligomerer stöchiometrischer Formen nachgewiesen werden (Tabelle III.12, Abb. III.22). Es erscheint somit offensichtlich, dass eine funktionale Reifung der SH bis in die stationäre Phase (Phase VI) dadurch ermöglicht wird, dass alle rekombinanten *Cn* Proteine innerhalb heterogener Komplexe bzw. physiologischer Konformationen zu einem gewissen Grad vor proteolytischer Degradation geschützt sind. Folglich wären die Stressantworten, welche eingangs des Abschnittes dargestellt wurden, als Vorteil für die rekombinanten *Cn* Proteine zu werten. Das „Aufräumen“ des zellulären Proteinanteils würde auf diese Weise auf Kosten der endogenen und/oder nicht korrekt gefalteten rekombinanten Proteine, nicht jedoch der stöchiometrischen Komplexe gehen, welche sich folglich innerhalb des Cytosols partiell anreichern könnten. Aufgrund mangelnder Daten zu gereinigten Hyp-Komplexen wurde ein derartiges Phänomen bislang nicht beschrieben.

Mit Ausnahme dieser Arbeit erfolgten alle bisher demonstrierten erfolgreichen [NiFe]-Hydrogenase-Produktionen in *E. coli*-Stämmen unter strikt anaeroben Bedingungen [185,286-288,322]. Der Grund, sich *a priori* für dieses Vorgehen zu entscheiden, liegt auf der einen Seite in der mangelnden Kenntnis der O₂-Stabilität und aeroben Funktionalität beteiligter Reifungsproteine. Auf der anderen Seite beherbergt *E. coli* selbst [NiFe]-Hydrogenasen, weswegen es erstrebenswert sein kann, endogene Reifungsmaschinerien unter Bedingungen maximaler Funktionalität zu beteiligen ([286] und weitere Beispiele in Tabelle IV.1).

Das *E. coli* Genom kodiert mindestens vier [NiFe]-Hydrogenasen [158]. Hyd-1 (kodiert in *hyaABCDEF* ← Strukturgene für kleine und große H₂ase-Untereinheit hervorgehoben) ist eine periplasmatische O₂-tolerante und unidirektionale Aufnahme-Hydrogenase. Sie ist hauptsächlich unter fermentativen Bedingungen relevant und erlaubt bei fluktuierenden O₂-Konzentrationen die stabile Elektroneneinspeisung in den Chinol-Pool [423]. Das Enzym dient unter anderem der Rezyklisierung von durch den Formiat-Hydrogenlyase-Komplex (FHL) gebildetem Wasserstoff. Ein weiteres periplasmatisches, jedoch O₂-sensitives und bidirektionales Enzym ist die Hyd-2 (*hybOABCDEFG*). Elektronen aus dem Chinol-Pool beziehend oder in diesen einspeisend, fungiert die Hyd-2 möglicherweise als Elektronen-Ablassventil unter strikt anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit nicht vergärbare C-Quellen wie Fumarat (+ H₂) [158,423]. Hyd-3 (*hyc*-Operon) bildet den H₂ase-Teil des FHL-Komplexes und ist als multimeres, aufgrund seiner Labilität schwer isolierbares Enzym bekannt [158]. Der FHL-Komplex entgiftet fermentativ gebildetes Formiat durch Spaltung

desselben in CO₂ und H₂. Homologe aller Hyd-3 Untereinheiten finden sich auch innerhalb des *hyf*-Operons (Hyd-4). Hyd-4 ist eine Membran gebundene Bildungs-H₂ase, wobei die Expression als vergleichsweise schwach beschrieben wurde und die präferierten Bedingungen zur *hyf*-Induktion nach wie vor nicht vollends verstanden sind [424].

Hyd-2- und Hyd-3-Synthese setzt strikt anaerobe Bedingungen voraus und wird durch das Fnr-Protein (Akronym für **F**umarat-**N**itrat-**R**eduktion) reguliert. Eine maximale Derepression der FHL-Synthese setzt die zusätzliche Anwesenheit von Formiat voraus, da dieses den FhlA-Regulator aktiviert [425]. Hyd-1-Synthese hingegen ist nicht Fnr-abhängig und wird stattdessen durch das 2-Komponenten-System ArcA/B, sowie durch den bei Wachstumsverlangsamung wirksamen Regulator AppY reguliert [426]. ArcA induziert die Hyd-1- und reprimiert gleichzeitig die Hyd-2-Synthese [427]. Das ArcA/B-System ist hierbei redoxabhängig und zeigt seine maximale Regulationswirkung unter mikroaeroben Bedingungen [428], so dass die Transkription des *hya*-Operons unter den in Phase V vorliegenden Bedingungen (Abb. III.13a) durchaus möglich sein könnte.

Die Reifung der Hydrogenasen in *E. coli* erfolgt durch teils pleiotrope (Hyp) und teils spezifische Reifungsproteine. HypBDEF sind essentiell für die Reifung aller Hydrogenasen, während HypA und HypC nur für die HycE-Assemblierung (Hyd-3) vonnöten sind. Für die Reifung von Hyd-1 und -2 werden die analogen Proteine HybF (HypA Analog) sowie HybG (HypC Analog) benötigt [158]. HyaD (Hyd-1), HybD (Hyd-2) sowie HycI (Hyd-3) sind jeweils spezifische C-terminale Proteasen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Aussage, welche der Reifungsfaktoren aller drei *E. coli* Hydrogenasen die Reifung heterologer [NiFe]-Hydrogenasen unterstützen könnte, schwierig. Jedoch ist für den SH-Produktionsprozess eine eingehendere Analyse möglich. Wie oben beschrieben enthält beispielsweise das Hya-Operon keinerlei pleiotrope Reifungsproteine, während die Synthese von HybF und HybG unter den gegebenen Bedingungen unwahrscheinlich erscheint (siehe oben). Somit könnten lediglich die Hyp-Proteine unter den SH-Produktionsbedingungen an der Reifung beteiligt sein. Das Operon *hypABCDEfhlA* benachbart das *hyc*-Operon (welches *hypF* beherbergt), die Transkriptionsrichtungen verläuft jedoch invers [159,429]. Zwei Promotoren initiieren die Transkription des *hyp*-Operons: P_{hyp} liegt stromaufwärts von *hypA* und wird σ^{54} - und/oder FhlA-abhängig (in Kombination mit der Präsenz von Formiat) reguliert. Ein zweiter Promotor, P_{hypA}, liegt innerhalb des *hypA*-ORFs und kontrolliert σ^{70} - (konstitutiv) und Fnr-abhängig die Transkription von *hypBCDEfhlA* [425]. Folglich findet selbst unter aeroben Bedingungen stets eine schwache konstitutive Transkription des *hyp*-Operons statt. Die Anwesenheit der Hyp-Proteine (inkl. HypF, dessen Synthese zusammen mit den *hyc*-

Genprodukten reguliert wird) wurde entsprechend auch in ΔFnr -Mutanten bestätigt [430] und kann auch für die SH-Produktionsbedingungen angenommen werden. Ein Hinweis auf die Anwesenheit von HypF konnte auch in dieser Arbeit geliefert werden: Dieses wird zwingend für die SH-Reifung benötigt [316], und die Stämme K1A $\Delta HypE1F2$ und K1B $\Delta HypE2F3$ wiesen ca. 1% bzw. 4% Restaktivität auf, was einzig anhand einer Komplementation durch den endogenen Reifungsapparat erklärt werden kann (Tabelle III.13). Abschnitt IV.7 liefert eine diesbezügliche Analyse der Komplementationsfähigkeit einzelner Reifungssätze.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigte sich, dass der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) eine Reihe von Mangelercheinungen hinsichtlich anaerober Stoffwechselwege aufweist, die sich mit Mutationen in mehreren diesbezüglich essentiellen Genen begründen lässt [430]. Die meisten dieser Mutationen sind still, jedoch besitzt der Stamm aufgrund eines internen Stopp-Kodons innerhalb des *fnr*-Gens einen inaktiven globalen Transkriptionsregulator Fnr. Dies hat einen Hydrogenase-negativen Phänotyp zur Folge, obwohl die Hyp-Maschinerie (wie oben beschrieben) präsent ist. Der Grund: Das Nickel-Aufnahmesystem (NikADE) ist Fnr-abhängig und wird in *E. coli* Wildtyp-Stämmen ausschließlich unter strikt anaeroben Bedingungen synthetisiert [125]. Nickel-Aufnahme unter aeroben Bedingungen und in Abwesenheit von Fnr erfolgt unspezifisch über das Magnesium-Transportsystem [431]. Höhere Nickel-Konzentrationen im Medium können das Fehlen von NikADE folglich partiell komplementieren ([432] und diese Arbeit). Gleiches gilt für den Stamm BL21 (DE3), dessen Hyd-1- und Hyd-2-Aktivitäten durch Zugabe von 0,5 mM Nickel zum Medium wiederhergestellt werden können [430]. Dies zeigt, dass die Basis-Systeme für eine rekombinante SH-Produktion (CarAB⁸, Hyp-Proteine, Eisen-Aufnahme und FeS-Cluster-Synthese sowie Flavin-Metabolismus) funktional sein mussten. Durch *in-vivo*-Reifung der SH sowie der Demonstration aller essentiellen enzymologischen Charakteristika des gereinigten Enzyms (Abschnitt IV.5) wurde dies bestätigt (Tabelle III.6). Zusätzlich wurde mit HoxN1 eine hochaffine Nickel-Permease aus *Cn* eingebracht, um den rekombinanten Stämmen ein spezifisches Aufnahmesystem zur Verfügung zu stellen. Dies hatte eine substantielle Erhöhung der Reifungseffizienz zur Folge und bestätigte die zentrale Bedeutung der zellulären Nickel-Konzentration für den Reifungsprozess (Tabelle III.6, Abb. III.12). Die zuvor bereits in *E. coli* demonstrierte Funktionalität von HoxN1 [241] konnte darüber hinaus durch den engen Toleranzbereich der resultierenden Stämme gegenüber extrazellulären Nickel-Konzentrationen gezeigt werden. Eine Supplementation $>1 \mu\text{M}$ NiCl_2 hatte eine Verlangsamung der Wachstumsrate zur Folge und verringerte die Reifungseffizienz

⁸ CarAB = Carbamoylphosphat-Synthetase (Gene: *carAB*)

substantiell (Abb. III.12). Dies kann als Indikator für einen Selektionsdruck auf Abstoßung des Plasmids angesehen werden. Besagter Effekt, welcher mit einer möglichen Intoxikation der Zellen durch Ni^{2+} -Ionen assoziiert werden kann, wurde mit bemerkenswerter Ähnlichkeit hinsichtlich des tolerierten Konzentrationsbereichs auch in *Cn* beobachtet [219].

IV.5 Rekombinante SH zeigt die enzymologischen Charakteristika des Wildtyp-Enzyms.

Die *Cn* SH gehört zu den am besten untersuchten Vertretern der [NiFe]-Hydrogenasen überhaupt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Produktion großer Mengen des Enzyms im heterologen System zu ermöglichen. Damit lag der Fokus von vornherein weniger auf neuen Erkenntnissen über die strukturellen Eigenschaften der SH, sondern dem Nachweis, dass das heterologe System zur korrekten funktionalen Assemblierung des Metalloenzym befähigt ist. In vergleichbaren Versuchen zur heterologen Produktion von [NiFe]-Hydrogenasen waren bislang lediglich Machbarkeitsnachweise erbracht worden. Sowohl hinsichtlich der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms als auch der volumetrischen Ausbeute konnten in dieser Arbeit neue Maßstäbe gesetzt werden (Tabelle IV.1). Ausbeuten im Milligramm-Bereich pro Liter Kultur, verbunden mit höheren spezifischen Aktivitäten als jemals für Wildtyp-Präparationen der SH erreicht wurden, demonstrieren das Potential der entwickelten Plattform (Tabellen III.9,10, IV.1). Reinigungen des Enzyms wurde seit der ersten Isolierung im Jahre 1976 ($55 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [140]) wiederholt beschrieben. Mit der repetitiven Isolierung ging eine stetige Verbesserung der Qualität einher: SH-Aktivitäten lagen in diesen Fällen bei $57 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [250], $85 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [116], $102 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [254] und schließlich nach den zu Beginn von Kapitel III.3 genannten Optimierungsschritten bei $202 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ [203]. Letztere Arbeit dokumentierte erstmals die Bedeutung einer „Kontrolle des Redoxpotentials“ während der Reinigung und brachte in diesem Kontext Anhaltspunkte für die stark variierende Qualität verschiedener SH-Präparationen⁹. Auch in dieser Arbeit wurden sowohl für die tetramere als auch hexamere SH-Variante Präparationen variabler Qualität erzeugt, wobei die Aktivität des Ausgangsmaterials und/oder die Reinigungsbedingungen als ausschlaggebend angesehen werden (Anhang, Tabellen VI.3,4). Die qualitativ besten Enzympräparationen (SH_{Var1} , SH_{Var2} ; Abschnitt III.3.2) wurden der ebenfalls isolierten Wildtyp-Variante (aus *Cn*; Abschnitt III.3.1) vergleichend gegenüber gestellt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die rekombinante SH alle für das Wildtyp-Enzym charakteristischen und essentiellen Eigenschaften aufwies und die

⁹ Die „Qualität“ einer SH-Präparation bezieht sich in dieser Arbeit auf folgende Merkmale: Anaerobe spezifische Aktivität; Aerobe spezifische Aktivität (bei Präparationen guter Qualität ca. 75–80% der anaeroben Aktivität); Ausprägung/Länge der sogenannten „lag“ Phase bei Abwesenheit eines Aktivators (siehe Text & Tabelle III.11).

Qualität der in [203] beschriebenen Präparation erreicht werden konnte. Im Falle der SH_{Var2} wurde sogar ein neuer Höchstwert hinsichtlich der spezifischen Aktivität erreicht (Tabelle III.11).

Für die Messung der physiologischen ($\text{H}_2\text{:NAD}^+$) Aktivität ist neben dem vollständig assemblierten [NiFe]-Zentrum erwiesenermaßen das Vorhandensein aller Kofaktoren (FMN-a, FMN-b, jeweils vier [4Fe-4S]- und ein [2Fe-2S]-Cluster) essentiell [246]. Mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie konnte der korrekte Einbau der redoxaktiven Kofaktoren zusätzlich untermauert werden (Abb. III.19). Die für die SH charakteristische O_2 -Toleranz, deren Ursache weiterhin unter Diskussion steht (Abschnitt IV.8), konnte für alle Varianten anhand der aeroben photometrischen Messung in An- bzw. Abwesenheit von Aktivatoren bestätigt werden (Tabelle VI.4). Das Fehlen besagter Aktivatoren (NAD(P)H) kann hierbei einer Bestimmung der Länge der sogenannten „lag“ Phase und damit einer Abschätzung des Anteils zu Messbeginn aktiver SH-Moleküle dienen. Auch dies ist ein Gradmesser für die Qualität einer Präparation, da die „lag“ Phase sich umso geringer ausprägt, je größer der Anteil aktiver Enzymmoleküle einer Probe ist [140,202]. Die „lag“ Phase bezeichnet das Zeitintervall beginnend mit dem Assay-Startpunkt (NAD^+ -Zugabe) bis zum Erreichen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit und tritt auf, da der Anteil inaktiver (oxidiert)er SH-Moleküle zunächst reduziert werden muss. Üblicherweise wird hierzu ein katalytischer Überschuss NAD(P)H zugegeben [140,243]. Ist dieser nicht vorhanden, erfolgt die Aktivierung autokatalytisch, d. h. der geringe Anteil bereits aktiver SH-Moleküle setzt NAD^+ mit H_2 zu NADH um, welches daraufhin die sukzessive Aktivierung oxidiert)er Enzymmoleküle erlaubt. Dies ist der Grund, warum die SH innerhalb der zellfreien *E. coli* Extrakte üblicherweise selbst ohne NAD(P)H keinerlei „lag“ Phase aufweist, da der Extrakt offenbar ausreichende Mengen der Aktivatormoleküle in den Assay einträgt (Tabelle VI.4).

Homogene rekombinante SH-Präparationen konnten durch eine zweistufige Reinigung (StrepTactin- gefolgt von Größenausschluss-Chromatographie) hergestellt werden (Tabellen III.9,10). Für die hexamere SH_{Var2} war der Feinreinigungs-Schritt insbesondere dazu nötig, um den StrepII-HoxI-Überschuss zu entfernen (Abb. III.17b), welcher erstaunlicherweise innerhalb der StrepTactin-Fraktion über 90% des gesamten Proteins ausmachte (Tabelle III.10). Besagter HoxI-Überschuss wurde bereits in *Cn* beobachtet, wo die Untereinheit (ursprünglich noch als SH-unabhängiges „B-Protein“ bezeichnet) unter „dereprimierenden“ heterotrophen Bedingungen über 4% des zellulären Gesamtproteingehalts ausmachen kann [211,433]. Da das *hoxI*-Gen in *Cn* als Teil des SH-Operons transkribiert wird (Abb. III.1), kann dieser Überschuss bei Vergleich mit den übrigen SH-Untereinheiten nur durch eine

deutlich höhere Stabilität des nativen, komplex-unabhängigen HoxI-Proteins erklärt werden. Tatsächlich zeigte sich StrepII-HoxI unter nahezu allen Expressionsbedingungen als vollständig löslich, während mit Ausnahme von StrepII-HoxH keine der SH-Untereinheiten einzeln und außerhalb des SH-Komplexes isoliert werden konnte (Abschnitt III.4.1).

IV.6 Das zellfreie SH-Maturationssystem (ZFM) und seine Anwendbarkeit

In-vitro-Systeme zur Aktivierung von [FeFe]- bzw. [NiFe]-Hydrogenasen stellen attraktive Plattformen zur Untersuchung benötigter Komponenten von Reifungsprozessen dar und könnten künftig zur Bestimmung essentieller und limitierender Zwischenschritte dienen. Zellfreie Techniken wurden bislang fast ausschließlich für die Aufklärung der [FeFe]-Hydrogenase-Reifung eingesetzt, entweder durch Kombination der benötigten Proteine in gereinigter Form bzw. als Bestandteile rekombinanter Extrakte [81,82,344,345] oder durch vollständige *in-vitro*-Transkription/Translation/Maturation [343]. Der Reifungsprozess von [FeFe]-Hydrogenasen ist hierfür prädestiniert, da neben der generellen FeS-Cluster-Synthesemaschinerie lediglich drei Reifungsproteine (HydE, HydF und HydG) für die H-Cluster-Assemblierung vonnöten sind [78]. Als Konsequenz wurde bislang lediglich *ein* zellfreies System für den deutlich komplexeren, eine Vielzahl an Hilfsproteinen benötigenden Prozess der Aktivierung von [NiFe]-Hydrogenasen entwickelt [346]. Hierbei handelte es sich um ein wirtseigenes System, da anaerob hergestellte *E. coli* Extrakte sowie homolog überexprimierte Reifungsproteine für die Prozessierung der endogenen [NiFe]-Hydrogenasen verwendet wurden. Demgegenüber wurde innerhalb dieser Arbeit die erste zellfreie *in-vitro*-Reifung einer heterologen [NiFe]-Hydrogenase vorgestellt (Abschnitt III.4.4). Der Basis-Assay des präsentierten ZFM-Systems beinhaltet neben den essentiellen Komponenten lediglich die Kombination rekombinanter zellfreier Extrakte. Das Volumen ist beliebig skalierbar, wodurch Hochdurchsatz-Screening-Kompatibilität gegeben ist.

Das entwickelte SH-ZFM-System diente innerhalb dieser Arbeit dazu, weitere und genauere Einblicke in den Reifungsprozess zu gewinnen als dies im *in-vivo*-System möglich ist. Damit liegt das Einsatzgebiet des Systems im Bereich der Grundlagenforschung, wohingegen die Eignung als effizientes SH-Produktionssystem limitiert ist. Die spezifischen Aktivitäten des *in-vivo*-Systems konnten (noch) nicht erreicht werden, wenngleich unter Einsatz des ZFM-Systems ebenfalls spezifische Aktivitäten im $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ -Bereich erzielt werden konnten (zum Vergleich: $1,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ im ZFM- und $7,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ im *in vivo*-System; Abschnitt III.4.4 und Tabelle III.6). Somit können mithilfe des Systems bereits geringe Aktivitätsänderungen statistisch signifikant erfasst werden und bei Bedarf auch ausreichende Mengen der

Intermediate produziert und isoliert werden (Abb. III.33). Zur Reinigung homogener SH-Präparationen scheint das System jedoch nicht geeignet (Abb. III.33). Dies verringert folglich die Eignung der ZFM für die Produktion des funktionalen Biokatalysators, birgt aber andererseits Potential zur Erfassung und Charakterisierung relevanter Reifungsintermediate.

IV.7 *In-vivo*- und *in-vitro*-SH-Produktionssysteme zur Untersuchung des Reifungsprozesses

Die Untersuchung des SH-Reifungsprozesses hinsichtlich relevanter Komplexintermediate (Abschnitt III.4.1), essentieller Faktoren und Komplexe des Prozesses (III.4.2, 4.4) und der Möglichkeit zur Komplementation durch alternative Reifungssätze (III.4.3, 4.4) wurde als neu definiertes Teilziel nach erfolgreicher Entwicklung der Klonierungs- und Expressionsplattform bearbeitet (Zielsetzung Abschnitt I.5). Die gewonnen Erkenntnisse über den SH-Reifungsprozess gingen in den Entwicklungsprozess der SH-Produktionsstämme (Tabelle III.6) ein, indem minimale bzw. essentielle Anforderungen für die *in-vivo*-Reifung definiert werden konnten. Deletions- und Substitutionsexperimente (*in vivo* und *in vitro*; Abschnitte III.4.2, 4.3, 4.4) ergaben ein kohärentes Gesamtbild über die Spezifität des M1-Reifungssatzes sowie die Fähigkeit der endogenen *E. coli* Hyp-Proteine und des M2-Satzes zur partiellen Komplementation. Einerseits wurde auf diese Weise erstmalig der Nachweis für die Funktionalität der in *hyd4* kodierten Genprodukte (M2-Satz) erbracht. Andererseits führten die Untersuchungen zu der überraschenden Erkenntnis, dass M1-Proteine durch M2-Analoga partiell komplementiert werden können (Abb. III.29). Im Falle der *E. coli* Proteine konnte selbiges festgestellt werden mit der Ausnahme, dass der endogene Reifungsapparat nicht zur Komplementation der Protease HoxW befähigt ist (Abb. III.27). Der Grad der *in-vivo*-Komplementation, erfassbar durch die Restaktivität der jeweiligen Deletions- oder Substitutionsstämme, variierte hierbei stark und lag mit Ausnahme weniger Beispiele unter 10% der K1A-Aktivität (Tabelle III.13). ZFM-Experimente hingegen ergaben ein verändertes Bild und wiesen auf deutlich geringere Effekte bei Fehlen der *Cn*-Komplexe unter *in-vitro*-Bedingungen hin (Abb. III.31a). Folglich ist die Rolle der *E. coli* Hyp-Analoga innerhalb des zellfreien Systems deutlich höher einzustufen. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der *in-vivo*- bzw. *in-vitro*-SH-Reifungsbedingungen erschwert. Damit verbunden ist die ohnehin schwierig zu treffende Unterscheidung zwischen Effekten der Proteinlöslichkeit und der Rolle des jeweiligen Hyp-Komplexes im *in-vivo*- versus ZFM-System. Für den M2-Satz beispielsweise zeigte die Deletion von HypE2F3 *in vivo* den geringsten Effekt (Abb. III.27b), während das umgekehrte Bild im ZFM-System (Ausnahme: HypX/HoxW) beobachtet wurde (Abb.

III.31b). Hierbei liegt folglich der Schluss nah, dass der lösliche Anteil von HypE2F3¹⁰ im *in-vitro*-Experiment höher lag und der Einfluss seines Fehlens folglich deutlicher sichtbar war. Die funktionale Substituierbarkeit des M2-Satzes durch *E. coli* Analoga war deutlich ausgeprägter als im Falle der M1-Proteine beobachtet. Dies und die Feststellung, dass das Aktivitätsoptimum des M1-Satzes bei 30 °C (optimale Wachstumstemperatur von *Cn*), das der M2-Proteine jedoch bei 37 °C lag (Abb. III.30c), fördert die These, dass das *hyd4*-Operon durch ein evolutionär vergleichsweise junges horizontales Gentransfer-Ereignis in das *Cn*-Genom gelangt ist [206]. Hierbei sei auf eine aktuelle Studie verwiesen, in welcher die Funktionalität des in *hyd4* kodierten Enzyms als „Aktinobakterielle Aufnahme-Hydrogenase“ (AH) biochemisch demonstriert wurde [242]. Demnach gehört die AH einer neu entdeckten Gruppe von [NiFe]-Hydrogenasen an, welche derart hohe Affinitäten für H₂ aufweisen, dass sie ihrem Wirt (prominentester Vertreter: *Streptomyces avermitilis*) die Umsetzung atmosphärischen Wasserstoffs ermöglichen [434-436]. Die *Cn* AH ist mit einem *K_M*-Wert >1 µM hierzu nicht befähigt. Eine physiologische Rolle des Enzyms bleibt weiterhin ungeklärt, da ΔSH/MBH-Doppelmutanten nicht zu lithoautotrophem Wachstum befähigt sind [242]. Dennoch bestätigten diese Ergebnisse in Kombination mit M2-Studien dieser Arbeit erstmals die Funktionalität aller *hyd4*-kodierten Genprodukte. Als Erkenntnis dieser Arbeit verbleiben in diesem Zusammenhang Hinweise darauf, dass die MBH- und SH-Operon-kodierten Hyp-Proteine mit den in *hyd4* kodierten Genprodukten lediglich eine partielle funktionale Überschneidung aufweisen. Dies steht im Gegensatz zu den bisher bekannten *Cn* Hyp-Proteinen, welche als pleiotrop hinsichtlich der MBH-, RH- und SH-Reifung bekannt sind [316]. Diese Arbeit liefert erste Ansätze für die Demonstration eines Zusammenspiels verschiedener Hyp-Maschinerien. Mit der Isolierung eines Komplexes zwischen HypC1 (M1) und HypD2 (M2) gelang der erste direkte biochemische Nachweis einer solchen Interaktion (Abb. III.21L). Von vergleichbarer Bedeutung war darüber hinaus der Nachweis der stabilen Komplex-Bildung zwischen HypC2 (M2) und HoxH (Abb. III.21h).

Die Funktionalität der HypCDEF-Analoga für M1 und M2 konnte sowohl im Verbund als auch in der Einzelanalyse demonstriert werden. HypC1, HypE1 und HypF2 zeigten sich im Gegensatz zu HypD1 unter Autoinduktionsbedingungen partiell bzw. vollständig löslich (Abb. III.20a,b,c). Hinsichtlich HypD1 waren im Falle des monomeren HypD aus *E. coli*

¹⁰ Hierbei sei auf die Tatsache verwiesen, dass die für ZFM-Deletionsexperimente kombinierten Hyp-Komplexe in der Form von **Einzelextrakten** zugegeben wurden (siehe auch Tabelle III.14). In Einzelfällen (z. B. HypE2F3) resultierte dies möglicherweise in erhöhter Löslichkeit der Komplexe verglichen mit Gesamtextrakten, welche die *in-vivo*-Situation wohl am Ehesten imitieren.

ähnliche Löslichkeitsprobleme beobachtet worden [337]. Bereits in Abschnitt IV.4 war von einer Korrelation zwischen der Anfälligkeit der M1- und M2-Proteine für Proteolyse sowie Aggregation und deren nativer Konformation berichtet worden. Im Einklang mit dieser These steht auch die Vermutung, dass es sich im Falle von StrepII-HypF2 bei den koeluierten „Kontaminanten“ um C-terminal verkürzte Proteolyseprodukte handelte, da HypF2 im Gegensatz zu HypC1, HypE1 bzw. HypB2 (Abb. III.22) keine oligomeren nativen Formen einnimmt (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreiche Isolierung des HypC1D1E1 trinären Komplexes (Abb. III.21d) demonstriert die Funktionalität aller drei Proteine sowie HypF2 *in vivo* (Abschnitt III.4.1). HypF2, welches nicht Teil des trinären Komplexes ist, wird zur Ausbildung desselben benötigt, da es im Vorfeld die essentielle Modifikation an HypE1 (Mobilisierung und Transfer des Carbamoylrests; Abb. I.2) katalysiert. Als Konsequenz konnte in Abwesenheit des *hypF2*-Gens lediglich HypC1-StrepII bzw. letzteres im Verbund mit HypD1 gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Analytische Gelfiltration lieferte einen ersten Hinweis auf die physiologische Stöchiometrie des HypC1D1E1-Komplexes, wobei neben der trinären auch eine hexamere (HypC1D1E1)₂-Konformation postuliert werden kann (Abb. III.22c, III.23a). Isolierung eines HypE1-HypF2-Komplexes war weder mit getagtem HypE1 noch HypF2 möglich. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Cyanylierung von HypE1 zur Auflösung des Komplexes mit HypF2 führt, so dass HypE1-C≡N in Abwesenheit eines präformierten Akzeptor-Fe-HypC1/HypD1-Intermediats als „Endprodukt“ anfällt. Die quantitative Isolierung des stöchiometrischen HypC1D1E1-Komplexes wiederum spricht dafür, dass HypE1 den trinären Komplex erst dann verlässt, wenn der Transfer der assemblierten Fe(CN)₂CO-Gruppe auf HoxH stattgefunden hat. Da das *hoxH*-Gen in den betroffenen Stämmen nicht koexprimiert wurde, würde auch der trinäre Komplex ein „Sackgassen“-Intermediat darstellen.

Anhand der erfolgreichen Isolierung sämtlicher relevanten Komplexe (Ausnahme: HypE1F2 und HypE2F3) zeigt sich die Stabilität individuell produzierter Intermediate. Dadurch wird eine mögliche Erklärung geliefert, warum die Effekte der Komplex-Deletionen im ZFM-System geringer ausfielen als *in vivo* (Abb. III.31a,b). Angenommen, die *E. coli* Hyp-Analoga wären zur autarken Synthese des [NiFe]-Zentrums an HoxH befähigt, so würde eine Akquirierung des aktiven Zentrums bei einem Teil der in ZFM-Ansätzen zugesetzten SH-Untereinheiten (Extrakte 1A, 1B, 1C; Tabelle III.14) bereits während der Proteinproduktion/Kultivierung erfolgen. Da dort jedoch die spezifische Protease HoxW fehlt, würden diese prä-assemblierten SH-Moleküle in einem inaktiven Zustand verbleiben. Bei Kombination der SH-Extrakte mit HoxW im ZFM-Assay würde der Anteil der HoxH-Moleküle, welche das

[NiFe]-Zentrum bereits beinhalten, anschließend prozessiert (C-terminal verkürzt) und wäre damit bereits in Abwesenheit bestimmter *Cn*-Hyp-Proteine aktiv. Bei *in-vivo*-Reifung würde dementsprechend eine andere Situation entstehen, da in diesem Fall während der Kultivierung bereits ein Teil der *Cn hyp*-Gene koexprimiert wird (Deletions-Experimente; Abschnitt III.4.2). In diesem Falle ist eine direkte Interaktion zwischen den verschiedenen Hyp-Maschinerien vonnöten, was sich möglicherweise aufgrund von Konkurrenzreaktionen weniger effizient als eine vollständig von den *E. coli* Analoga übernommene „Vor-Reifung“ (Ausnahme: HoxW) darstellen würde. Hierbei sei auf die unterschiedlichen Aktivitätsmaxima in Korrelation mit der Temperatur (Abb. III.30c) sowie die Vermutung verwiesen, dass die endogene Hyp-Maschinerie womöglich erst innerhalb der fortgeschrittenen Wachstumsphasen (V, VI) selbst aktiv und damit relevant ist. Folglich ist die Komplementation hier geringer ausgeprägt (Abb. III.27).

Über die Interaktion der Nickel-Insertionsproteine HypA und HypB mit Hydrogenase-Untereinheiten ist wenig bekannt. Ein gegenwärtiges Modell schlägt vor, dass HypA als „Nickel-Speicher“ fungiert und durch Komplexbildung mit dem HypB-Homodimer ein Nickel-Ion auf dieses überträgt [437]. HypB ist eine GTPase, und tatsächlich wird vermutet, dass GTP-Hydrolyse zur Auflösung des Homodimer vonnöten ist, so dass das an der Dimerisierungs-Bindestelle befindliche Nickel-Ion freigesetzt und auf die H₂ase-Untereinheit übertragen werden kann [190]. Einige Organismen wie *E. coli* benötigen zusätzlich die Prolyl-*cis/trans*-Isomerase SlyD für den Nickeleinbau [438-441].

Die Demonstration einer Isolierung des HypAB-Komplexes wurde bislang lediglich in *einem* Falle beschrieben [437]. Innerhalb dieser Arbeit wurden drei verschiedene Varianten des funktionalen Komplexes isoliert: Der HypA2B2-Komplex (M1) wurde sowohl mit N-terminal getaggtm HypA2 (Abb. III.21e) als auch HypB2 (Abb. III.21f) gereinigt. Obwohl sich die HypA-Bindestelle am N-terminalen Ende von HypB befindet [437], schien der Affinitäts-Tag keinen Einfluss auf die Komplexbildung auszuüben. Dies bestätigte sich auch für HypA3//StrepII-HypB3 (M2; Abb. III.21k). Nativgele des StrepII-HypA2//HypB2-Komplexes (Coomassie & Western-Blot mit Anti-StrepII-Konjugat) in Kombination mit analytischer Gelfiltration zeigten, dass sowohl der heterogene Komplex als auch HypB2 allein mehrere oligomere Formen einnehmen können (Abb. III.22d & III.23b). Eine Spezies mit der molekularen Masse von ca. 84 kDa deutete hierbei auf die offenbar dominante Form (HypA2)₁-(HypB2)₂ hin (Abb. III.23b), welche im Einklang mit den obigen Ausführungen und [437] steht. Die Erfassung dieses Komplexes in Abwesenheit von HoxH könnte hierbei

bedeuten, dass GTP-Hydrolyse die Anwesenheit des Substrats (HoxH-Fe(CN)₂CO)) erfordert und der Nickel-beladene HypA₂B₂-heterotrimeräre Komplex aus diesem Grund (analog dem im Falle von HypC1D1E1 beobachteten Phänomen; siehe oben) als „Sackgassen“-Intermediat anfällt. Auch dies spricht für die Funktionalität und Stabilität des rekombinanten Komplexes in *E. coli*. Die Untersuchung einer möglichen direkten Komplexbildung von StrepII-getaggt HypA₂B₂-Analoga mit HoxH könnte weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Nickel-Einschleusung liefern. Diesbezügliche Experimente sind gegenwärtig in Planung.

HypAB beschleunigt die Nickel-Einbaureaktion, scheint jedoch nicht essentiell zu sein. Der Einbau des für die Aktivität von [NiFe]-Hydrogenasen essentiellen redoxaktiven Nickelions scheint demzufolge spontan möglich, da die H₂ase-Aktivität in ΔHypAB-Mutanten durch Erhöhungen der extrazellulären Nickel-Konzentration partiell komplementiert werden kann [160,163,174,316,442-444]. Dies konnte auch in dieser Arbeit erneut bestätigt werden (Abb. III.12, III.31a,b), wenngleich auf mögliche Komplementationen durch die *E. coli* HypAB-Analoga verwiesen werden muss. Letztere Möglichkeit kann nicht mit Sicherheit geklärt werden, da die Expression der *hyp*-Gene in *E. coli* unter den SH-Produktionsbedingungen entweder durch P_{hyp} (*hypA* wird exprimiert) oder P_{hypA} (*hypA* wird nicht exprimiert) bzw. beide in Kombination kontrolliert sein könnte (Abschnitt IV.4). Die HypA₃B₃-Proteine sind zur Komplementation der HypA₂B₂-Proteine sowohl *in vivo* (>60% der K1A-Aktivität; Abb. III.29a) als auch *in vitro* (vollständige Komplementation; Abb. III.31c) befähigt. Sollten die *E. coli* Analoga grundsätzlich zu einer ähnlichen Komplementation befähigt sein, wäre dies ein Hinweis auf verminderte endogene *Ec* HypA-Konzentrationen und damit der Transkriptionskontrolle durch P_{hypA}. Vieles würde in diesem Falle darauf hindeuten, dass die HypAB-assistierte Nickel-Einschleusung für bestimmte Hydrogenasen deutlich weniger selektiv wäre als der Einbau der Eisen-Gruppe.

IV.8 HoxW besitzt ein redoxaktives FeS-Cluster.

C-terminale Proteasen schließen den Reifungsprozess durch Verkürzung einer jeweils spezifischen H₂ase-Untereinheit ab (im Falle von HoxH: 24 Aminosäuren), woraufhin eine Umschließung des aktiven Zentrums und damit die Assemblierung des Holoenzym erlaubt wird (Abb. I.2). Die Substraterkennung erfolgt an einem Spaltungsmotiv, welches einer Peptidsequenz (im Falle von HoxH: Cx₂Cx₂H/R) in Kombination mit dem eingebauten Nickel-Ion entspricht [168,169,195,196,198]. Die Nickel-Erkennungsstelle war bislang als einziges konserviertes Strukturmotiv in HoxW-analogen Proteasen bekannt (Abb. IV.1), und Reinigungen bzw. Charakterisierungen sind für Proteine dieser Gruppe nicht dokumentiert.

Dementsprechend stellt die in dieser Arbeit vorgestellte homogene Isolierung des *Cn* HoxW-Proteins eine Pionierleistung dar. Das gereinigte Protein zeigte überraschend eine starke Braun-Färbung, und UV/Vis-Spektren des oxidierten sowie reduzierten Enzyms deuteten klar auf die Präsenz eines redoxaktiven [4Fe-4S]-Clusters hin (Abb. III.24a). Nachdem innerhalb der Primärsequenz vier Cysteinyreste mit einem Ferredoxin-typischen Cx₂Cx₂C-Motiv sowie einem entfernt liegenden Cystein identifiziert werden konnten (Abb. III.25), wurde ein Sequenz-Alignment durchgeführt (Abb. IV.1). Hierbei muss berücksichtigt werden, dass neben Cystein weitere Aminosäuren (z. B. Histidin) Eisenatome koordinieren können. Das Cx₂Cx₂C-Motiv hingegen ist lediglich dann als Hinweis auf eine Ferredoxin-typische [4Fe-4S]-Koordination anzusehen, wenn alle drei Cysteiny-Reste vorliegen [331,338,339].

HoxW-Analoga mit der größten Sequenzähnlichkeit zu *Cn* HoxW beinhalten partiell vorhandene FeS-Bindemotive in gleicher Anordnung, die jedoch mit Ausnahme eines Vertreters nicht vollständig vorhanden sind (Abb. IV.1). Bei besagter Ausnahme handelt es sich um das HoxW-Protein aus *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (*Mv*), einem strikt aeroben gram-positiven Bakterium, welches aufgrund der Fähigkeit zum Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAKs) umweltbiotechnologisch relevant ist [445]. Innerhalb des *Mv* Genoms (<http://jgi.doe.gov>) sind neben einem vollständigen Satz *hyp*-Gene vier putative Gene für eine bidirektionale [NiFe]-Hydrogenase annotiert (Locus Mvan_4113-4116). Eine biochemische Charakterisierung relevanter Genprodukte für den H₂-Metabolismus des Organismus steht bislang aus. In den nachfolgenden Betrachtungen wurde jedoch berücksichtigt, dass es sich bei *Mv* um einen obligaten Aerobier handelt.

Die Besonderheit der SH im Vergleich zu weiteren (bereits charakterisierten) Vertretern der Gruppe 3d-[NiFe]-Hydrogenasen (Abschnitt I.2.2.3.2) ist der HoxY-gebundene Kofaktor FMN-a [246,253]. Aufgrund der Fähigkeit von Flavinen, als 2-zu-1-Elektronenkonverter zu fungieren, ist FMN-a als essentielles Motiv hinsichtlich der O₂-Toleranz der SH im Gespräch [247,253]. Unter reduktiven Bedingungen (H₂, NADH) ist der Kofaktor reversibel gebunden. Es wurde beschrieben, dass unter solch elektronenreichen Bedingungen eine langsame Öffnung des Enzyms, verbunden mit dem letztendlichen Verlust von FMN-a und der Exposition des [NiFe]-Zentrums stattfindet [246]. Dies führt zu einem Abbruch der Elektronen-Transportkette zwischen dem [NiFe]-Zentrum und dem FeS-Relay (Verlust der H₂:NAD⁺-Aktivität) sowie der irreversiblen Inaktivierung des Enzyms in Gegenwart von O₂. Unter reduzierenden Bedingungen ist dieser Vorgang reversibel, sofern externes FMN vorhanden ist. Aus diesem Grunde enthalten SH-Enzymassays stets 1-5 µM FMN (Abschnitt II.4.5.1). Oxidiertes FMN kann hingegen nicht akquiriert werden [246].

Av	-----MNARIVLLALGNPERGDDGAGPAVAARLRGRLPAGVA----LRLC
Gh	MKNSD-----KPLHLHDFGLIYGIGNVGREDDGLGWAFIDAIEAL---GET-DAKLVRH
Mv	----- MNLGDFDDDDSLIYIGIGNVGRQDDGLGWAFVDWLEAQ---GRCP SAQLQRS
Ro	MNESVKFPHVTLDYFDSPLIYIGIGNVGRQDDGLGWAFIDWIEEE---GL CP KAEILRH
Cn	MNAPAEFFPYVTLADFDDPSTLIYIGIGNVGRQDDGLGWAFIDRLEAE---SL C SGAEVQRH
Rm	MNAPAEFFPLVTLEDFDDPSSLIYIGIGNVGRQDDGLGWALIDWLEAE---SL CP KAEIQRH
Nitr	-----MTAPLPLLIIFYGNPSRGDDALGPLLLEYLETL----KLPHVEFLTD
Mc	-----MAGLLVFGYGNPSRGDDALGPLFLEALQIRLASSPGVDIEFLQD
Syn	-----MKQTLMIGYGNTLRSDDGAGQKVAEAF--F----DQENITAIAT
Lm	MMN-----SNPKNTQKTVLVLGYGNPIRRDDGIGQIVATEVENW----NIPNVKCLAL
	: : . * * * *
Av	DGDLGQIETWRDLEALVCVDASAPQGEF--GRIRRLDPGADGLFRDISLTSS HG FLAE
Gh	YQLFFEDVDLIRRHQRVLFVDATKSVT-TSQFKVERVEPRLDDSF----- SH AISVQS
Mv	YQLLIEDADLISTKRRVLFVDATKDES-VTSFELRRPAPRMDFTF-----SH AISVPA
Ro	YQLHLEDAELISHKKRVLFVDATKDAS-VTSFALERAEPRMDFSFT----- SH AISIPA
Cn	YQLHLEADLISRKRKVLFI DATKDAS-VASFS LERAEPRMDFSFT-----SH AISIPS
Rm	YQLHLEADLISRKRKVLFI DATKDAS-VESFT LERAE PKMDFSFT----- SH AISIPS
Nitr	FQLQVEHALDLKNREKVLFI DASVSCTAPY--AFTRLHARKDTNYT-----SH AMTPMA
Mc	FQLQIEHALDLAGRDRVLFV DAHVGCP PPF--RFERLVPQRDGSYT----- TH AVSPQA
Syn	HQLTPELVEDLVQVEQVYFID AAP---- ETVTIKPIQRDNEHNF----- GH FIDPKS
Lm	HQLLPEVAETLSLVDLAIFV DASITGETV ELLPLKPL--ETTELNW----- GH HLNPQS
	: * * . * .
Av	ALGLARTLG-LAPPRVVVYALEGSRFTPGAPLSGAVAAALDGLAARLLDELVR LA AK---
Gh	IVAM CCQ CY-QAFPDVWLLTIKGTQWDLSLGLTPEADNNLKLALSSVLSEGIVETPY--S
Mv	IMATCQ CCF-G CLPEVYVLAIRGF ELAMGLTRAAQRNLDIVTAC LSSPG PVGNAT-- T
Ro	IMAT CQ CCF-QRLPDVYVLP IKGYEWE LELGLTQRRARQNLNAATARLSIRTGASIS----
Cn	IMATCQ RCF-Q CLPEVYVLAIRGYEWE LRMGLTPQARHNLD DAIAHFS MR AERQTS ----
Rm	IMAT CQ CCF-QRLPEVYVLAIRGYEWE LKMGLT QRRARQNLDDATAYLAMRRSVESRE--F
Nitr	VLHTYRELY-GNPPPAYLLEVRGERFELGEPLSSEAAASNLEASLDLLRKLYSETHLPEWE
Mc	LLEVYRRINRDEPPPAYLLSIRGERFDLGDA LSR SAESNLESALRFAEVLIGATPGTAWD
Syn	LLNLAQEIIY-HYAPDAYLVLI PAQDF KLGENYSEITQKAIETAIHLLQERLTPCMK----
Lm	LLTLAKTLY-HKTPEAWLISVPGVDFELGENLSETAKQGV TIALEKIKQLIT -----
	: . * . : : : : : . :
Av	--A-----PAR-----S-----
Gh	ATA-SSNAIDS---PMTKSIECTRITT
Mv	ATT-GGTRPHR---TAAVSSDSHR---
Ro	-----
Cn	-----
Rm	S-----
Nitr	QFINHETLP-----
Mc	ALCPRGEIRNTAFWPWGCSARCCR---
Syn	-----
Lm	-----

Abb. IV.1 – Sequenzalignment einer Auswahl von HoxW-Analoga mit wichtigen Motiven. Die Nickel-Erkennungssequenz ist in grün dargestellt, während putative FeS-Cluster-Bindemotive in gelb hervorgehoben sind. Av = *Azotobacter vinelandii* HoxW; Gh = *Grimontia hollisiae* HoxW; Mv = *Mycobacterium vanbaalenii* HoxW; Ro = *Rhodococcus opacus* HoxW; Cn = *Cupriavidus necator* HoxW; Rm = *Ralstonia metallidurans* HoxW; Nitr = *Nitrosospira* sp. APG3 HoxW; Mc = *Methylococcus capsulatus* HoxW; Syn = *Synechococcus* sp. PCC 7002 HoxW; Lm = *Lyngbya majuscula* HoxW.

Da Flavine in Anwesenheit von Sauerstoff rasch oxidiert werden, könnte unter derartigen Bedingungen eine neue Rolle für HoxW definiert werden. FMN-a befindet sich gemäß gegenwärtiger Modelle innerhalb des SH-Holoenzym in unmittelbarer Nachbarschaft zum

Nickelatom des aktiven Zentrums [253]. Durch diese räumliche Nähe wäre folglich eine duale Rolle von HoxW denkbar. Demnach würde die Maturase sowohl eine Verkürzung von HoxH als auch die Einschleusung reduzierten FMNs katalysieren, welche wie oben beschrieben unter aeroben Bedingungen nicht spontan erfolgen kann. Für die Reduktion des Flavins wäre dementsprechend das redoxaktive [4Fe-4S]-Cluster vonnöten. Alternativ wäre eine direkte Reduktion des Nickels im aktiven Zentrum denkbar, welches wie zuvor beschrieben als Bindestelle von HoxW fungiert. Jedoch sind die formulierten Theorien momentan mit der klaren Einschränkung verbunden, dass keine Daten über das mittlere Redoxpotential sowie die Stabilität des FeS-Clusters in HoxW vorliegen. Folglich bleiben sämtliche Überlegungen rein spekulativ, solange das Protein nicht mittels Redox Titration, EPR- und Mössbauer-Messungen bzw. Stabilitätsassays in Gegenwart von O₂ genauer charakterisiert wurde. Die hierfür benötigten Vorbereitungen und Experimente sind gegenwärtig in Planung.

In *Cn* sind mittlerweile mehrere Reifungsfaktoren bekannt, welche spezifisch in Anwesenheit von Sauerstoff wirksam werden. HypX wird beispielsweise gemäß kürzlich veröffentlichten Ergebnissen unter aeroben Bedingungen eine Rolle in der Mobilisierung und Übertragung des Carbonyl-Liganden auf das Eisenatom zugesprochen [446]. Die MBH-spezifischen Reifungsfaktoren HoxR und HoxT sind in Anwesenheit atmosphärischer O₂-Konzentrationen relevant, wo sie die Assemblierung des für die O₂-Toleranz der MBH essentiellen FeS-Clusters übernehmen [226]. Weitere biochemische sowie strukturanalytische Charakterisierungen von HoxW könnten folglich weitere Puzzleteile hinsichtlich der hochkomplexen Mechanismen von *Cn* zur Bildung O₂-toleranter Hydrogenasen liefern.

IV.9 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die erfolgreiche Entwicklung einer kombinatorischen, modularen Multigen-Expressionsplattform für *Escherichia coli*. Das System ermöglicht die Koexpression einer beliebigen Anzahl heterologer Gene und eröffnet damit neue Wege in der synthetischen Biologie und damit in Bereichen, wo die Implementierung komplexer Stoffwechselmodule sowie die Knüpfung neuer regulatorischer Netzwerke von Bedeutung ist. Das Potential des Systems wurde durch Produktion und Reifung einer O₂-toleranten, löslichen [NiFe]-Hydrogenase (SH) aus dem „Knallgas“-Bakterium *Cupriavidus necator* in *E. coli* demonstriert. Anhand des Fallbeispiels der SH wurde gezeigt, dass einerseits die modulare Assemblierungstechnologie und die mittels Vektorkombinatorik sowie Modulverteilung vermittelte Gendosis, andererseits jedoch die Flexibilität der Induktions- und Expressionstechnik für die funktionale Reifung komplexer rekombinanter Metalloenzyme von

essentieller Bedeutung ist. Als Konsequenz wurden mithilfe des Systems *in-vivo*- und *in-vitro*-Reifungsstudien, Isolierungen sämtlicher relevanten Reifungsintermediate und schlussendlich die funktionale Hochausbeute-Produktion des Zielenzyms ermöglicht. Somit wurden nahezu alle ehemals auf das Wirtssystem beschränkten, teils ineffizienten und zeitaufwändigen Schritte im Rahmen der biochemischen, molekularbiologischen und enzymologischen Hydrogenase-Forschung in das heterologe System transplantiert. Neue Erkenntnisse hinsichtlich der Hyp-Komplex-Bildungen und –Stöchiometrie, limitierender Faktoren des Reifungssystems und der funktionalen Komplementation endogener wie auch zweier heterologer Reifungssätze wurden gewonnen und diskutiert. Dies spiegelt die Möglichkeiten des Systems für künftige vergleichbare Fälle komplexer proteinassistierter Reifungswege wider. Mithilfe der Methodik für den vollständigen Transfer heterologer Multigen-Module werden darüber hinaus Möglichkeiten für umfangreiche gentechnische Manipulationen (z. B. Mutagenese-Studien) zur Verfügung gestellt. Auf diese Weise könnten aufwendige, in vielen Fällen maßgeschneiderte Methoden innerhalb der Wirtsorganismen auf einheitliche, systematische Strategien innerhalb des heterologen Systems übertragen werden. Auf das Zielenzym bezogen konnte die Produktion des funktionalen Biokatalysators im industriellen Maßstab sowie die Isolierung desselben in maximaler Reinheit und Ausbeute demonstriert werden. Somit steht das Enzym künftig einerseits der angewandten als auch der grundlagenorientierten, strukturanalytischen Forschung zur Verfügung. Das Anwendungspotential O₂-toleranter Hydrogenasen wurde bereits in Abschnitt I.4 verdeutlicht. Im Rahmen der Grundlagenforschung sind strukturelle Merkmale der Enzyme von Bedeutung, angefangen von den Mechanismen der O₂-Toleranz bis hin zu den molekularen Grundlagen der H₂-Aktivierung. Hierzu werden beispielsweise die Aktivierungs- und Redoxzustände des Nickelatoms anhand der erfassbaren paramagnetischen Zustände (EPR) bzw. Streckschwingungen der Eisen-Liganden (FTIR) [116] oder einer Kombination von Beidem (RR) [447] untersucht. Die Möglichkeit, das Enzym in großen Mengen und bislang unerreichter Reinheit verfügbar zu machen, könnte künftig den Weg zur Kristallisierung und strukturanalytischen Untersuchung der SH und somit dem ersten bidirektionalen H₂-aktivierenden Enzym ebnen. Selbiges gilt für die Hyp-Komplexe sowie die spezifische C-terminale Protease HoxW. Hierzu ist eine genaue Charakterisierung des Proteins und möglicher Kofaktoren gegenwärtig in Planung. Der in dieser Arbeit erstmals vorgestellte Befund, dass das Enzym möglicherweise ein redoxaktives [4Fe-4S]-Cluster besitzt, könnte im Rahmen weiterführender Untersuchungen möglicherweise den Schlüssel zur O₂-Toleranz der SH liefern.

V REFERENZEN

1. **Winsche, WE, Hoffman, KC, Salzano, FJ (1973)** Hydrogen: Its Future Role in the Nation's Energy Economy. *Science* **180**(4093): 1325-1332.
2. **Zuttel, A, Remhof, A, Borgschulte, A, Friedrichs, O (2010)** Hydrogen: the future energy carrier. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **368**(1923): 3329-3342.
3. **Edwards, PP, Kuznetsov, VL, David, WI (2007)** Hydrogen energy. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **365**(1853): 1043-1056.
4. **Sigfusson, TI (2007)** Pathways to hydrogen as an energy carrier. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **365**(1853): 1025-1042.
5. **Armaroli, N, Balzani, V (2011)** The hydrogen issue. *ChemSusChem* **4**(1): 21-36.
6. **Miller, SL (1953)** A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* **117**(3046): 528-529.
7. **Sumper, M, Luce, R (1975)** Evidence for de novo production of self-replicating and environmentally adapted RNA structures by bacteriophage Qbeta replicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(1): 162-166.
8. **Wächtershäuser, G (1990)** Evolution of the first metabolic cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(1): 200-204.
9. **Wächtershäuser, G (1992)** Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog Biophys Mol Biol* **58**(2): 85-201.
10. **Kasting, JF (1993)** Earth's early atmosphere. *Science* **259**(5097): 920-926.
11. **Tian, F, Toon, OB, Pavlov, AA, De Sterck, H (2005)** A hydrogen-rich early Earth atmosphere. *Science* **308**(5724): 1014-1017.
12. **Catling, DC (2006)** Comment on "A hydrogen-rich early Earth atmosphere". *Science* **311**(5757): 38; author reply 38.
13. **Chapelle, FH, O'Neill, K, Bradley, PM, Methe, BA, Ciufo, SA, Knobel, LL, Lovley, DR (2002)** A hydrogen-based subsurface microbial community dominated by methanogens. *Nature* **415**(6869): 312-315.
14. **Takai, K, Gamo, T, Tsunogai, U, Nakayama, N, Hirayama, H, Nealson, KH, Horikoshi, K (2004)** Geochemical and microbiological evidence for a hydrogen-based, hyperthermophilic subsurface lithoautotrophic microbial ecosystem (HyperSLiME) beneath an active deep-sea hydrothermal field. *Extremophiles* **8**(4): 269-282.
15. **Vignais, PM, Billoud, B, Meyer, J (2001)** Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **25**(4): 455-501.
16. **Margulis, L (1970)** Origin of Eukaryotic Cells. New Haven, CT: Yale Univ. Press.
17. **Martin, W, Muller, M (1998)** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**(6671): 37-41.
18. **Moreira, D, Lopez-Garcia, P (1998)** Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol* **47**(5): 517-530.
19. **Doolittle, WF (1998)** A paradigm gets shift. *Nature* **392**(6671): 15-16.
20. **Stephenson, M, Stickland, LH (1931)** Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J* **25**(1): 205-214.
21. **De Lacey, AL, Moiroux, J, Bourdillon, C (2000)** Simple formal kinetics for the reversible uptake of molecular hydrogen by [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Eur J Biochem* **267**(22): 6560-6570.
22. **Tatsumi, H, Takagi, K, Fujita, M, Kano, K, Ikeda, T (1999)** Electrochemical study of reversible hydrogenase reaction of *Desulfovibrio vulgaris* cells with methyl viologen as an electron carrier. *Anal Chem* **71**(9): 1753-1759.
23. **Fontecilla-Camps, JC, Volbeda, A, Cavazza, C, Nicolet, Y (2007)** Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem Rev* **107**(10): 4273-4303.

24. Ogata, H, Lubitz, W, Higuchi, Y (2009) [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Trans* (37): 7577-7587.
25. De Lacey, AL, Fernandez, VM, Rousset, M, Cammack, R (2007) Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. *Chem Rev* **107**(10): 4304-4330.
26. Stein, M, Lubitz, W (2004) Relativistic DFT calculation of the reaction cycle intermediates of [NiFe] hydrogenase: a contribution to understanding the enzymatic mechanism. *J Inorg Biochem* **98**(5): 862-877.
27. Curtis, CJ, Miedaner, A, Ciancanelli, R, Ellis, WW, Noll, BC, Rakowski DuBois, M, DuBois, DL (2003) $[\text{Ni}(\text{Et}_2\text{PCH}_2\text{NMeCH}_2\text{PEt}_2)_2]^{2+}$ as a functional model for hydrogenases. *Inorg Chem* **42**(1): 216-227.
28. Thauer, RK, Kaster, AK, Goenrich, M, Schick, M, Hiromoto, T, Shima, S (2010) Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H_2 storage. *Annu Rev Biochem* **79**: 507-536.
29. Hedderich, R, Forzi, L (2005) Energy-converting [NiFe] hydrogenases: more than just H_2 activation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**(2-4): 92-104.
30. Hedderich, R (2004) Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *J Bioenerg Biomembr* **36**(1): 65-75.
31. Hendrickson, EL, Leigh, JA (2008) Roles of coenzyme F_{420} -reducing hydrogenases and hydrogen- and F_{420} -dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases in reduction of F_{420} and production of hydrogen during methanogenesis. *J Bacteriol* **190**(14): 4818-4821.
32. Ragsdale, SW, Pierce, E (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO_2 fixation. *Biochim Biophys Acta* **1784**(12): 1873-1898.
33. Ragsdale, SW (2008) Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 129-136.
34. Huang, H, Wang, S, Moll, J, Thauer, RK (2012) Electron bifurcation involved in the energy metabolism of the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* growing on glucose or H_2 plus CO_2 . *J Bacteriol* **194**(14): 3689-3699.
35. Liang, J, Burris, RH (1988) Hydrogen burst associated with nitrogenase-catalyzed reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9446-9450.
36. Schick, HJ (1971) Interrelationship of nitrogen fixation, hydrogen evolution and photoreduction in *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Mikrobiol* **75**(2): 102-109.
37. Schubert, KR, Evans, HJ (1976) Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(4): 1207-1211.
38. Seefeldt, LC, Hoffman, BM, Dean, DR (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu Rev Biochem* **78**: 701-722.
39. Dixon, RO (1972) Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Arch Mikrobiol* **85**(3): 193-201.
40. Dixon, RO (1978) Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in Rhizobia. *Biochimie* **60**(3): 233-236.
41. Ishii, S, Kosaka, T, Hori, K, Hotta, Y, Watanabe, K (2005) Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* **71**(12): 7838-7845.
42. Bélaich, J-P, Bruschi, M, Garcia, J-L (1990) Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer. New York: Plenum Press.
43. Traore, AS, Fardeau, ML, Hatchikian, CE, Le Gall, J, Belaich, JP (1983) Energetics of Growth of a Defined Mixed Culture of *Desulfovibrio vulgaris* and *Methanosarcina barkeri*: Interspecies Hydrogen Transfer in Batch and Continuous Cultures. *Appl Environ Microbiol* **46**(5): 1152-1156.
44. Ushida, K, Newbold, CJ, Jouany, JP (1997) Interspecies hydrogen transfer between the rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum* and *Methanosarcina barkeri*. *J Gen Appl Microbiol* **43**(2): 129-131.
45. Shively, JM, van Keulen, G, Meijer, WG (1998) Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annu Rev Microbiol* **52**: 191-230.
46. Müller, M (1993) The hydrogenosome. *J Gen Microbiol* **139**(12): 2879-2889.

47. Calusinska, M, Happe, T, Joris, B, Wilmotte, A (2010) The surprising diversity of clostridial hydrogenases: a comparative genomic perspective. *Microbiology* **156**(Pt 6): 1575-1588.
48. Horner, DS, Heil, B, Happe, T, Embley, TM (2002) Iron hydrogenases - ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **27**(3): 148-153.
49. Kim, DH, Kim, MS (2011) Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresour Technol* **102**(18): 8423-8431.
50. Levin, DB, Pitt, L, Love, M (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* **29**: 173-185.
51. Manish, S, Banerjee, R (2008) Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* **33**: 279-286.
52. Das, D, Khanna, N, Veziroglu, TN (2008) Recent developments in biological hydrogen production processes. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* **14**(2): 57-67.
53. Böhm, R, Sauter, M, Böck, A (1990) Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogen lyase components. *Mol Microbiol* **4**(2): 231-243.
54. Sawers, RG (2005) Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 42-46.
55. Vignais, PM, Billoud, B (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev* **107**(10): 4206-4272.
56. Schleucher, J, Griesinger, C, Schworer, B, Thauer, RK (1994) H₂-forming N₅, N₁₀-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* catalyzes a stereoselective hydride transfer as determined by two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **33**(13): 3986-3993.
57. Thauer, RK, Klein, AR, Hartmann, GC (1996) Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst. *Chem Rev* **96**(7): 3031-3042.
58. Afting, C, Hochheimer, A, Thauer, RK (1998) Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F₄₂₀ reduction with H₂. *Arch Microbiol* **169**(3): 206-210.
59. Afting, C, Kremmer, E, Brucker, C, Hochheimer, A, Thauer, RK (2000) Regulation of the synthesis of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) and of HmdII and HmdIII in *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch Microbiol* **174**(4): 225-232.
60. Shima, S, Thauer, RK (2007) A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem Rec* **7**(1): 37-46.
61. Zirngibl, C, Hedderich, R, Thauer, RK (1990) N₅,N₁₀-Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. *FEBS Lett* **261**(1): 112-116.
62. Hiromoto, T, Ataka, K, Pilak, O, Vogt, S, Stagni, MS, Meyer-Klaucke, W, Warkentin, E, Thauer, RK, Shima, S, Ermler, U (2009) The crystal structure of C176A mutated [Fe]-hydrogenase suggests an acyl-iron ligation in the active site iron complex. *FEBS Lett* **583**(3): 585-590.
63. Hiromoto, T, Warkentin, E, Moll, J, Ermler, U, Shima, S (2009) The crystal structure of an [Fe]-hydrogenase-substrate complex reveals the framework for H₂ activation. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(35): 6457-6460.
64. Shima, S, Lyon, EJ, Sordel-Klippert, M, Kauss, M, Kahnt, J, Thauer, RK, Steinbach, K, Xie, X, Verdier, L, Griesinger, C (2004) The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase hmd: structure of the light-inactivation product. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**(19): 2547-2551.
65. Shima, S, Pilak, O, Vogt, S, Schick, M, Stagni, MS, Meyer-Klaucke, W, Warkentin, E, Thauer, RK, Ermler, U (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science* **321**(5888): 572-575.
66. Lyon, EJ, Shima, S, Buurman, G, Chowdhuri, S, Batschauer, A, Steinbach, K, Thauer, RK (2004) UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **271**(1): 195-204.

67. Lyon, EJ, Shima, S, Boecher, R, Thauer, RK, Grevels, FW, Bill, E, Roseboom, W, Albracht, SP (2004) Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc* **126**(43): 14239-14248.
68. Happe, T, Hemschemeier, A, Winkler, M, Kaminski, A (2002) Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci* **7**(6): 246-250.
69. Meyer, J (2007) [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* **64**(9): 1063-1084.
70. Happe, T, Kaminski, A (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **269**(3): 1022-1032.
71. Fournier, M, Dermoun, Z, Durand, MC, Dolla, A (2004) A new function of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress. *J Biol Chem* **279**(3): 1787-1793.
72. Nicolet, Y, Cavazza, C, Fontecilla-Camps, JC (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J Inorg Biochem* **91**(1): 1-8.
73. Peters, JW (1999) Structure and mechanism of Fe-only hydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* **9**(6): 670-676.
74. Nicolet, Y, Piras, C, Legrand, P, Hatchikian, CE, Fontecilla-Camps, JC (1999) *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* **7**(1): 13-23.
75. Peters, JW, Lanzilotta, WN, Lemon, BJ, Seefeldt, LC (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**(5395): 1853-1858.
76. Cohen, J, Kim, K, King, P, Seibert, M, Schulten, K (2005) Finding gas diffusion pathways in proteins: application to O₂ and H₂ transport in Cpl [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects. *Structure* **13**(9): 1321-1329.
77. Cohen, J, Kim, K, Posewitz, M, Ghirardi, ML, Schulten, K, Seibert, M, King, P (2005) Molecular dynamics and experimental investigation of H₂ and O₂ diffusion in [Fe]-hydrogenase. *Biochem Soc Trans* **33**(1): 80-82.
78. Posewitz, MC, King, PW, Smolinski, SL, Zhang, L, Seibert, M, Ghirardi, ML (2004) Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem* **279**(24): 25711-25720.
79. Peters, JW, Szilagyi, RK, Naumov, A, Douglas, T (2006) A radical solution for the biosynthesis of the H-cluster of hydrogenase. *FEBS Lett* **580**(2): 363-367.
80. Driesener, RC, Challand, MR, McGlynn, SE, Shepard, EM, Boyd, ES, Broderick, JB, Peters, JW, Roach, PL (2010) [FeFe]-hydrogenase cyanide ligands derived from S-adenosylmethionine-dependent cleavage of tyrosine. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**(9): 1687-1690.
81. Kuchenreuther, JM, George, SJ, Grady-Smith, CS, Cramer, SP, Swartz, JR (2011) Cell-free H-cluster synthesis and [FeFe] hydrogenase activation: all five CO and CN⁻ ligands derive from tyrosine. *PLoS One* **6**(5): e20346.
82. Kuchenreuther, JM, Stapleton, JA, Swartz, JR (2009) Tyrosine, cysteine, and S-adenosyl methionine stimulate *in vitro* [FeFe] hydrogenase activation. *PLoS One* **4**(10): e7565.
83. Czech, I, Silakov, A, Lubitz, W, Happe, T (2009) The [FeFe]-hydrogenase maturase HydF from *Clostridium acetobutylicum* contains a CO and CN⁻ ligated iron cofactor. *FEBS Lett* **584**(3): 638-642.
84. Czech, I, Stripp, S, Sanganas, O, Leidel, N, Happe, T, Haumann, M (2010) The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF contains a H-cluster like [4Fe4S]-2Fe site. *FEBS Lett* **585**(1): 225-230.
85. Vincent, KA, Parkin, A, Armstrong, FA (2007) Investigating and exploiting the electrocatalytic properties of hydrogenases. *Chem Rev* **107**(10): 4366-4413.
86. Conrad, R (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol Rev* **60**(4): 609-640.
87. Vignais, PM, Colbeau, A (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* **6**(2): 159-188.

88. Volbeda, A, Charon, MH, Piras, C, Hatchikian, EC, Frey, M, Fontecilla-Camps, JC (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**(6515): 580-587.
89. Higuchi, Y, Ogata, H, Miki, K, Yasuoka, N, Yagi, T (1999) Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure* **7**(5): 549-556.
90. Higuchi, Y, Yagi, T, Yasuoka, N (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* **5**(12): 1671-1680.
91. Matias, PM, Soares, CM, Saraiva, LM, Coelho, R, Morais, J, Le Gall, J, Carrondo, MA (2001) [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modeling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c₃. *J Biol Inorg Chem* **6**(1): 63-81.
92. Happe, RP, Roseboom, W, Pierik, AJ, Albracht, SP, Bagley, KA (1997) Biological activation of hydrogen. *Nature* **385**(6612): 126.
93. Pierik, AJ, Roseboom, W, Happe, RP, Bagley, KA, Albracht, SP (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J Biol Chem* **274**(6): 3331-3337.
94. Volbeda, A, Garcin, E, Piras, C, De Lacey, AL, Fernandez, VM, Hatchikian, EC, Frey, M, Fontecilla-Camps, JC (1996) Structure of the [NiFe] Hydrogenase Active Site: Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands. *J Am Chem Soc* **118**(51): 12989 - 12996.
95. Fontecilla-Camps, JC, Frey, M, Garcin, E, Hatchikian, C, Montet, Y, Piras, C, Vernede, X, Volbeda, A (1997) Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie* **79**(11): 661-666.
96. Leroux, F, Dementin, S, Burlat, B, Cournac, L, Volbeda, A, Champ, S, Martin, L, Guigliarelli, B, Bertrand, P, Fontecilla-Camps, J, Rousset, M, Leger, C (2008) Experimental approaches to kinetics of gas diffusion in hydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(32): 11188-11193.
97. Montet, Y, Amara, P, Volbeda, A, Vernede, X, Hatchikian, EC, Field, MJ, Frey, M, Fontecilla-Camps, JC (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol* **4**(7): 523-526.
98. Garcin, E, Vernede, X, Hatchikian, EC, Volbeda, A, Frey, M, Fontecilla-Camps, JC (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* **7**(5): 557-566.
99. Valente, FM, Oliveira, AS, Gnadt, N, Pacheco, I, Coelho, AV, Xavier, AV, Teixeira, M, Soares, CM, Pereira, IA (2005) Hydrogenases in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: structural and physiologic characterisation of the membrane-bound [NiFeSe] hydrogenase. *J Biol Inorg Chem* **10**(6): 667-682.
100. Valente, FM, Pereira, PM, Venceslau, SS, Regalla, M, Coelho, AV, Pereira, IA (2007) The [NiFeSe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is a bacterial lipoprotein lacking a typical lipoprotein signal peptide. *FEBS Lett* **581**(18): 3341-3344.
101. Bingemann, R, Klein, A (2000) Conversion of the central [4Fe-4S] cluster into a [3Fe-4S] cluster leads to reduced hydrogen-uptake activity of the F₄₂₀-reducing hydrogenase of *Methanococcus voltae*. *Eur J Biochem* **267**(22): 6612-6618.
102. Fritsch, J, Löscher, S, Sanganas, O, Siebert, E, Zebger, I, Stein, M, Ludwig, M, De Lacey, AL, Dau, H, Friedrich, B, Lenz, O, Haumann, M (2011) [NiFe] and [FeS] Cofactors in the Membrane-Bound Hydrogenase of *Ralstonia eutropha* Investigated by X-ray Absorption Spectroscopy: Insights into O₂-Tolerant H₂ Cleavage. *Biochemistry* **50**(26): 5858-5869.
103. Fritsch, J, Scheerer, P, Frielingsdorf, S, Kroschinsky, S, Friedrich, B, Lenz, O, Spahn, CM (2011) The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature* **479**(7372): 249-252.
104. Goris, T, Wait, AF, Saggu, M, Fritsch, J, Heidary, N, Stein, M, Zebger, I, Lendzian, F, Armstrong, FA, Friedrich, B, Lenz, O (2011) A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat Chem Biol* **7**(5): 310-318.

105. Lukey, MJ, Roessler, MM, Parkin, A, Evans, RM, Davies, RA, Lenz, O, Friedrich, B, Sargent, F, Armstrong, FA (2011) Oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenases: the individual and collective importance of supernumerary cysteines at the proximal Fe-S cluster. *J Am Chem Soc* **133**(42): 16881-16892.
106. Shomura, Y, Yoon, KS, Nishihara, H, Higuchi, Y (2011) Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase. *Nature* **479**(7372): 253-256.
107. Lubitz, W, Reijerse, E, van Gastel, M (2007) [NiFe] and [FeFe] hydrogenases studied by advanced magnetic resonance techniques. *Chem Rev* **107**(10): 4331-4365.
108. Pandelia, ME, Ogata, H, Lubitz, W (2010) Intermediates in the catalytic cycle of [NiFe] hydrogenase: functional spectroscopy of the active site. *Chemphyschem* **11**(6): 1127-1140.
109. Pardo, A, De Lacey, AL, Fernandez, VM, Fan, Y, Hall, MB (2007) Characterization of the active site of catalytically inactive forms of [NiFe] hydrogenases by density functional theory. *J Biol Inorg Chem* **12**(6): 751-760.
110. Lamle, SE, Albracht, SP, Armstrong, FA (2004) Electrochemical potential-step investigations of the aerobic interconversions of [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: insights into the puzzling difference between unready and ready oxidized inactive states. *J Am Chem Soc* **126**(45): 14899-14909.
111. Ogata, H, Hirota, S, Nakahara, A, Komori, H, Shibata, N, Kato, T, Kano, K, Higuchi, Y (2005) Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure* **13**(11): 1635-1642.
112. Fernandez, VM, Rao, KK, Fernandez, MA, Cammack, R (1986) Activation and deactivation of the membrane-bound hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*, Norway strain. *Biochimie* **68**(1): 43-48.
113. van Gastel, M, Stein, M, Brecht, M, Schroder, O, Lendzian, F, Bittl, R, Ogata, H, Higuchi, Y, Lubitz, W (2006) A single-crystal ENDOR and density functional theory study of the oxidized states of the [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J Biol Inorg Chem* **11**(1): 41-51.
114. Brecht, M, van Gastel, M, Buhrke, T, Friedrich, B, Lubitz, W (2003) Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H₂-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **125**(43): 13075-13083.
115. Foerster, S, van Gastel, M, Brecht, M, Lubitz, W (2005) An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase. *J Biol Inorg Chem* **10**(1): 51-62.
116. Happe, RP, Roseboom, W, Egert, G, Friedrich, CG, Massanz, C, Friedrich, B, Albracht, SP (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett* **466**(2-3): 259-263.
117. Saggi, M, Teutloff, C, Ludwig, M, Brecht, M, Pandelia, ME, Lenz, O, Friedrich, B, Lubitz, W, Hildebrandt, P, Lendzian, F, Bittl, R (2010) Comparison of the membrane-bound [NiFe] hydrogenases from *R. eutropha* H16 and *D. vulgaris* Miyazaki F in the oxidized ready state by pulsed EPR. *Phys Chem Chem Phys* **12**(9): 2139-2148.
118. Kröger, A, Biel, S, Simon, J, Gross, R, Unden, G, Lancaster, CR (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1553**(1-2): 23-38.
119. Bernhard, M, Benelli, B, Hochkoeppler, A, Zannoni, D, Friedrich, B (1997) Functional and structural role of the cytochrome b subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur J Biochem* **248**(1): 179-186.
120. Eismann, K, Mlejnek, K, Zipprich, D, Hoppert, M, Gerberding, H, Mayer, F (1995) Antigenic determinants of the membrane-bound hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus* are exposed toward the periplasm. *J Bacteriol* **177**(21): 6309-6312.
121. Schink, B, Schlegel, HG (1979) The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta* **567**(2): 315-324.
122. Ballantine, SP, Boxer, DH (1985) Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **163**(2): 454-459.

123. Sargent, F, Ballantine, SP, Rugman, PA, Palmer, T, Boxer, DH (1998) Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit--identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hupB* mutant. *Eur J Biochem* **255**(3): 746-754.
124. Ballantine, SP, Boxer, DH (1986) Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **156**(2): 277-284.
125. Wu, LF, Mandrand-Berthelot, MA (1986) Genetic and physiological characterization of new *Escherichia coli* mutants impaired in hydrogenase activity. *Biochimie* **68**(1): 167-179.
126. Ogata, H, Kellers, P, Lubitz, W (2010) The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum*: characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state). *J Mol Biol* **402**(2): 428-444.
127. Weiner, JH, Bilous, PT, Shaw, GM, Lubitz, SP, Frost, L, Thomas, GH, Cole, JA, Turner, RJ (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* **93**(1): 93-101.
128. Sargent, F, Bogsch, EG, Stanley, NR, Wexler, M, Robinson, C, Berks, BC, Palmer, T (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J* **17**(13): 3640-3650.
129. Ludwig, M, Schulz-Friedrich, R, Appel, J (2006) Occurrence of hydrogenases in cyanobacteria and anoxygenic photosynthetic bacteria: implications for the phylogenetic origin of cyanobacterial and algal hydrogenases. *J Mol Evol* **63**(6): 758-768.
130. Brugna-Guiral, M, Tron, P, Nitschke, W, Stetter, KO, Burlat, B, Guigliarelli, B, Bruschi, M, Giudici-Orticoni, MT (2003) [NiFe] hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*: properties, function, and phylogenetics. *Extremophiles* **7**(2): 145-157.
131. Lenz, O, Strack, A, Tran-Betcke, A, Friedrich, B (1997) A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes species*. *J Bacteriol* **179**(5): 1655-1663.
132. Lenz, O, Friedrich, B (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12474-12479.
133. Schwartz, E, Gerischer, U, Friedrich, B (1998) Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. *J Bacteriol* **180**(12): 3197-3204.
134. Kleihues, L, Lenz, O, Bernhard, M, Buhrke, T, Friedrich, B (2000) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol* **182**(10): 2716-2724.
135. Buhrke, T, Brecht, M, Lubitz, W, Friedrich, B (2002) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*: biochemical and spectroscopic analysis of mutant proteins modified at a conserved glutamine residue close to the [NiFe] active site. *J Biol Inorg Chem* **7**(7-8): 897-908.
136. Black, LK, Fu, C, Maier, RJ (1994) Sequences and characterization of *hupU* and *hupV* genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in hydrogenase expression. *J Bacteriol* **176**(22): 7102-7106.
137. Vignais, PM, Elsen, S, Colbeau, A (2005) Transcriptional regulation of the uptake [NiFe]hydrogenase genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 28-32.
138. Buhrke, T, Lenz, O, Krauss, N, Friedrich, B (2005) Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J Biol Chem* **280**(25): 23791-23796.
139. Duché, O, Elsen, S, Cournac, L, Colbeau, A (2005) Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity. *FEBS J* **272**(15): 3899-3908.
140. Schneider, K, Schlegel, HG (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim Biophys Acta* **452**(1): 66-80.
141. Appel, J, Schulz, R (1996) Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim Biophys Acta* **1298**(2): 141-147.

142. Boison, G, Schmitz, O, Mikheeva, L, Shestakov, S, Bothe, H (1996) Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *FEBS Lett* **394**(2): 153-158.
143. Long, M, Liu, J, Chen, Z, Bleijlevens, B, Roseboom, W, Albracht, SP (2007) Characterization of a HoxEFUYH type of [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* and some EPR and IR properties of the hydrogenase module. *J Biol Inorg Chem* **12**(1): 62-78.
144. Rakhely, G, Kovacs, AT, Maroti, G, Fodor, BD, Csanadi, G, Latinovics, D, Kovacs, KL (2004) Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl Environ Microbiol* **70**(2): 722-728.
145. Schmitz, O, Boison, G, Hilscher, R, Hundeshagen, B, Zimmer, W, Lottspeich, F, Bothe, H (1995) Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur J Biochem* **233**(1): 266-276.
146. Pilkington, SJ, Skehel, JM, Gennis, RB, Walker, JE (1991) Relationship between mitochondrial NADH-ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. *Biochemistry* **30**(8): 2166-2175.
147. Albracht, SP (1993) Intimate relationships of the large and the small subunits of all nickel hydrogenases with two nuclear-encoded subunits of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* **1144**(2): 221-224.
148. Appel, J, Phunpruch, S, Steinmuller, K, Schulz, R (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol* **173**(6): 333-338.
149. Ma, K, Weiss, R, Adams, MW (2000) Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *J Bacteriol* **182**(7): 1864-1871.
150. Kunkel, A, Vorholt, JA, Thauer, RK, Hedderich, R (1998) An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **252**(3): 467-476.
151. Meuer, J, Bartoschek, S, Koch, J, Kunkel, A, Hedderich, R (1999) Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* **265**(1): 325-335.
152. Meuer, J, Kuettner, HC, Zhang, JK, Hedderich, R, Metcalf, WW (2002) Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8): 5632-5637.
153. Sapra, R, Bagramyan, K, Adams, MW (2003) A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7545-7550.
154. Andrews, SC, Berks, BC, McClay, J, Ambler, A, Quail, MA, Golby, P, Guest, JR (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogen lyase system. *Microbiology* **143**(11): 3633-3647.
155. Self, WT, Hasona, A, Shanmugam, KT (2004) Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**(2): 580-587.
156. Casalot, L, Rousset, M (2001) Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol* **9**(5): 228-237.
157. Böck, A, King, PW, Blokesch, M, Posewitz, MC (2006) Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol* **51**: 1-71.
158. Forzi, L, Sawers, RG (2007) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biomaterials* **20**(3-4): 565-578.
159. Lutz, S, Jacobi, A, Schlensog, V, Bohm, R, Sawers, G, Böck, A (1991) Molecular characterization of an operon (*hyp*) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**(1): 123-135.
160. Jacobi, A, Rossmann, R, Böck, A (1992) The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **158**(6): 444-451.
161. Kortlüke, C, Friedrich, B (1992) Maturation of membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* **174**(19): 6290-6293.
162. DERNEDDE, J, EITINGER, M, FRIEDRICH, B (1993) Analysis of a pleiotropic gene region involved in formation of catalytically active hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch Microbiol* **159**(6): 545-553.

163. Dervedde, J, Eitinger, T, Patenge, N, Friedrich, B (1996) *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *Eur J Biochem* **235**(1-2): 351-358.
164. Drapal, N, Böck, A (1998) Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. *Biochemistry* **37**(9): 2941-2948.
165. Maier, T, Böck, A (1996) Generation of active [NiFe] hydrogenase *in vitro* from a nickel-free precursor form. *Biochemistry* **35**(31): 10089-10093.
166. Maier, T, Drapal, N, Thanbichler, M, Böck, A (1998) Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis. *Anal Biochem* **259**(1): 68-73.
167. Magalon, A, Böck, A (2000) Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J Biol Chem* **275**(28): 21114-21120.
168. Theodoratou, E, Paschos, A, Magalon, A, Fritsche, E, Huber, R, Böck, A (2000) Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem* **267**(7): 1995-1999.
169. Theodoratou, E, Paschos, A, Mintz, W, Böck, A (2000) Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **173**(2): 110-116.
170. Blokesch, M, Magalon, A, Böck, A (2001) Interplay between the specific chaperone-like proteins HybG and HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, and 3 from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**(9): 2817-2822.
171. Paschos, A, Glass, RS, Böck, A (2001) Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett* **488**(1-2): 9-12.
172. Blokesch, M, Böck, A (2002) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J Mol Biol* **324**(2): 287-296.
173. Blokesch, M, Paschos, A, Theodoratou, E, Bauer, A, Hube, M, Huth, S, Böck, A (2002) Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem Soc Trans* **30**(4): 674-680.
174. Hube, M, Blokesch, M, Böck, A (2002) Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. *J Bacteriol* **184**(14): 3879-3885.
175. Paschos, A, Bauer, A, Zimmermann, A, Zehlein, E, Böck, A (2002) HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J Biol Chem* **277**(51): 49945-49951.
176. Blokesch, M, Paschos, A, Bauer, A, Reissmann, S, Drapal, N, Böck, A (2004) Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur J Biochem* **271**(16): 3428-3436.
177. Blokesch, M, Rohmoser, M, Rode, S, Böck, A (2004) HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J Bacteriol* **186**(9): 2603-2611.
178. Theodoratou, E, Huber, R, Böck, A (2005) [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 108-111.
179. Blokesch, M, Böck, A (2006) Properties of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypD. *FEBS Lett* **580**(17): 4065-4068.
180. Jones, AK, Lenz, O, Strack, A, Buhrke, T, Friedrich, B (2004) NiFe hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry* **43**(42): 13467-13477.
181. Soboh, B, Stripp, ST, Muhr, E, Granich, C, Braussemann, M, Herzberg, M, Heberle, J, Sawers, RG (2012) [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN⁻ ligands. *FEBS Lett* **586**(21): 3882-3887.
182. Birstel, I, Siebert, E, Winter, G, Hummel, P, Zebger, I, Friedrich, B, Lenz, O (2012) A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)₂(CO) moiety of [NiFe]-hydrogenase. *J Biol Chem* **287**(46): 38845-38853.
183. Watanabe, S, Matsumi, R, Arai, T, Atomi, H, Imanaka, T, Miki, K (2007) Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. *Mol Cell* **27**(1): 29-40.

184. Schiffels, J, Pinkenburg, O, Schelden, M, Aboulhaga, El-HAAA, Baumann, ME, Selmer, T (2013) An Innovative Cloning Platform Enables Large-Scale Production and Maturation of an Oxygen-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase from *Cupriavidus necator* in *Escherichia coli*. *PLoS One* **8**(7): e68812.
185. Lenz, O, Zebger, I, Hamann, J, Hildebrandt, P, Friedrich, B (2007) Carbamoylphosphate serves as the source of CN⁻, but not of the intrinsic CO in the active site of the regulatory [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett* **581**(17): 3322-3326.
186. Bürstel, I, Hummel, P, Siebert, E, Wisitruangsakul, N, Zebger, I, Friedrich, B, Lenz, O (2011) Probing the Origin of the Metabolic Precursor of the CO Ligand in the Catalytic Center of [NiFe] Hydrogenase. *J Biol Chem* **286**(52): 44937-44944.
187. Roseboom, W, Blokesch, M, Böck, A, Albracht, SP (2005) The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. *FEBS Lett* **579**(2): 469-472.
188. Forzi, L, Hellwig, P, Thauer, RK, Sawers, RG (2007) The CO and CN⁻ ligands to the active site Fe in [NiFe]-hydrogenase of *Escherichia coli* have different metabolic origins. *FEBS Lett* **581**(17): 3317-3321.
189. Atanassova, A, Zamble, DB (2005) *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J Bacteriol* **187**(14): 4689-4697.
190. Cai, F, Ngu, TT, Kaluarachchi, H, Zamble, DB (2011) Relationship between the GTPase, metal-binding, and dimerization activities of *E. coli* HypB. *J Biol Inorg Chem* **16**(6): 857-868.
191. Gasper, R, Scrima, A, Wittinghofer, A (2006) Structural insights into HypB, a GTP-binding protein that regulates metal binding. *J Biol Chem* **281**(37): 27492-27502.
192. Magalon, A, Blokesch, M, Zehelein, E, Böck, A (2001) Fidelity of metal insertion into hydrogenases. *FEBS Lett* **499**(1-2): 73-76.
193. Maier, T, Jacobi, A, Sauter, M, Böck, A (1993) The product of the *hypB* gene, which is required for nickel incorporation into hydrogenases, is a novel guanine nucleotide-binding protein. *J Bacteriol* **175**(3): 630-635.
194. Maier, T, Lottspeich, F, Böck, A (1995) GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**(1): 133-138.
195. Magalon, A, Böck, A (2000) Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. *FEBS Lett* **473**(2): 254-258.
196. Massanz, C, Fernandez, VM, Friedrich, B (1997) C-terminal extension of the H₂-activating subunit, HoxH, directs maturation of the NAD-reducing hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus*. *Eur J Biochem* **245**(2): 441-448.
197. Rossmann, R, Maier, T, Lottspeich, F, Böck, A (1995) Characterisation of a protease from *Escherichia coli* involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem* **227**(1-2): 545-550.
198. Thiemermann, S, DERNEDDE, J, Bernhard, M, Schroeder, W, Massanz, C, Friedrich, B (1996) Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* requires the *hoxW* gene product. *J Bacteriol* **178**(8): 2368-2374.
199. Buhrke, T, Friedrich, B (1998) *hoxX* (*hypX*) is a functional member of the *Alcaligenes eutrophus* *hyp* gene cluster. *Arch Microbiol* **170**(6): 460-463.
200. Durmowicz, MC, Maier, RJ (1997) Roles of HoxX and HoxA in biosynthesis of hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **179**(11): 3676-3682.
201. Rey, L, Fernandez, D, Brito, B, Hernando, Y, Palacios, JM, Imperial, J, Ruiz-Argueso, T (1996) The hydrogenase gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains an additional gene (*hypX*), which encodes a protein with sequence similarity to the N₁₀-formyltetrahydrofolate-dependent enzyme family and is required for nickel-dependent hydrogenase processing and activity. *Mol Gen Genet* **252**(3): 237-248.
202. Bleijlevens, B, Buhrke, T, van der Linden, E, Friedrich, B, Albracht, SP (2004) The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by way of a cyanide ligand to nickel. *J Biol Chem* **279**(45): 46686-46691.
203. van der Linden, E, Burgdorf, T, de Lacey, AL, Buhrke, T, Scholte, M, Fernandez, VM, Friedrich, B, Albracht, SP (2006) An improved purification procedure for the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*: new insights into its (in)stability and spectroscopic properties. *J Biol Inorg Chem* **11**(2): 247-260.

204. **Makkar, NS, Casida, LE (1987)** *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**(4): 323-326.
205. **Friedrich, B, Schwartz, E (1993)** Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu Rev Microbiol* **47**: 351-383.
206. **Cramm, R (2009)** Genomic view of energy metabolism in *Ralstonia eutropha* H16. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**(1-2): 38-52.
207. **Johnson, BF, Stanier, RY (1971)** Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **107**(2): 468-475.
208. **Berezina, N (2011)** Enhancing the 3-hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by *Cupriavidus necator*. *Biotechnol J* **7**(2): 304-309.
209. **Patnaik, PR (2006)** Dispersion optimization to enhance PHB production in fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha*. *Bioresour Technol* **97**(16): 1994-2001.
210. **Patnaik, PR (2007)** "Intelligent" descriptions of microbial kinetics in finitely dispersed bioreactors: neural and cybernetic models for PHB biosynthesis by *Ralstonia eutropha*. *Microb Cell Fact* **6**: 23.
211. **Schwartz, E, Voigt, B, Zuhlke, D, Pohlmann, A, Lenz, O, Albrecht, D, Schwarze, A, Kohlmann, Y, Krause, C, Hecker, M, Friedrich, B (2009)** A proteomic view of the facultatively chemolithoautotrophic lifestyle of *Ralstonia eutropha* H16. *Proteomics* **9**(22): 5132-5142.
212. **Kärst, U, Friedrich, CG (1984)** Mixotrophic capabilities of *Alcaligenes eutrophus*. *J Gen Microbiol* **130**: 1987-1994.
213. **Bowien, B, Kusian, B (2002)** Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol* **178**(2): 85-93.
214. **Friedrich, CG, Friedrich, B, Bowien, B (1981)** Formation of Enzymes of Autotrophic Metabolism During Heterotrophic Growth of *Alcaligenes eutrophus*. *J Gen Microbiol* **122**(1): 69-78.
215. **Schwartz, E, Buhrke, T, Gerischer, U, Friedrich, B (1999)** Positive transcriptional feedback controls hydrogenase expression in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* **181**(18): 5684-5692.
216. **Eberz, G, Friedrich, B (1991)** Three trans-acting regulatory functions control hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **173**(6): 1845-1854.
217. **Friedrich, CG (1982)** Derepression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebiphosphate carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **149**(1): 203-210.
218. **Chang, DE, Smalley, DJ, Conway, T (2002)** Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* **45**(2): 289-306.
219. **Friedrich, B, Heine, E, Finck, A, Friedrich, CG (1981)** Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **145**(3): 1144-1149.
220. **Friedrich, CG, Friedrich, B (1983)** Regulation of hydrogenase formation is temperature sensitive and plasmid coded in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **153**(1): 176-181.
221. **Burgdorf, T, Lenz, O, Buhrke, T, van der Linden, E, Jones, AK, Albracht, SP, Friedrich, B (2005)** [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**(2-4): 181-196.
222. **Bernhard, M, Schwartz, E, Rietdorf, J, Friedrich, B (1996)** The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J Bacteriol* **178**(15): 4522-4529.
223. **Frielingsdorf, S, Schubert, T, Pohlmann, A, Lenz, O, Friedrich, B (2011)** A Trimeric Supercomplex of the Oxygen-Tolerant Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Biochemistry* **50**(50): 10836-10843.
224. **Pandelia, ME, Bykov, D, Izsak, R, Infossi, P, Giudici-Orticoni, MT, Bill, E, Neese, F, Lubitz, W (2012)** Electronic structure of the unique [4Fe-3S] cluster in O₂-tolerant hydrogenases characterized by ⁵⁷Fe Mössbauer and EPR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(2): 483-488.

225. Pandelia, ME, Nitschke, W, Infossi, P, Giudici-Orticoni, MT, Bill, E, Lubitz, W (2011) Characterization of a unique [FeS] cluster in the electron transfer chain of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(15): 6097-6102.
226. Fritsch, J, Lenz, O, Friedrich, B (2011) The maturation factors HoxR and HoxT contribute to oxygen tolerance of membrane-bound [NiFe] hydrogenase in *Ralstonia eutropha* H16. *J Bacteriol* **193**(10): 2487-2497.
227. Parkin, A, Sargent, F (2012) The hows and whys of aerobic H₂ metabolism. *Curr Opin Chem Biol* **16**(1-2): 26-34.
228. Hogrefe, C, Romermann, D, Friedrich, B (1984) *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes (Hox). *J Bacteriol* **158**(1): 43-48.
229. Kuhn, M, Steinbuchel, A, Schlegel, HG (1984) Hydrogen evolution by strictly aerobic hydrogen bacteria under anaerobic conditions. *J Bacteriol* **159**(2): 633-639.
230. Buhrke, T, Lenz, O, Porthun, A, Friedrich, B (2004) The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol Microbiol* **51**(6): 1677-1689.
231. Friedrich, B, Buhrke, T, Burgdorf, T, Lenz, O (2005) A hydrogen-sensing multiprotein complex controls aerobic hydrogen metabolism in *Ralstonia eutropha*. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 97-101.
232. Lenz, O, Bernhard, M, Buhrke, T, Schwartz, E, Friedrich, B (2002) The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(3): 255-262.
233. Kortlüke, C, Horstmann, K, Schwartz, E, Rohde, M, Binsack, R, Friedrich, B (1992) A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* **174**(19): 6277-6289.
234. Pohlmann, A, Fricke, WF, Reinecke, F, Kusian, B, Liesegang, H, Cramm, R, Eitinger, T, Ewering, C, Potter, M, Schwartz, E, Strittmatter, A, Voss, I, Gottschalk, G, Steinbuchel, A, Friedrich, B, Bowien, B (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* **24**(10): 1257-1262.
235. Schwartz, E, Friedrich, B (2001) A physical map of the megaplasmid pHG1, one of three genomic replicons in *Ralstonia eutropha* H16. *FEMS Microbiol Lett* **201**(2): 213-219.
236. Schwartz, E, Henne, A, Cramm, R, Eitinger, T, Friedrich, B, Gottschalk, G (2003) Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol* **332**(2): 369-383.
237. Eberz, G, Eitinger, T, Friedrich, B (1989) Genetic determinants of a nickel-specific transport system are part of the plasmid-encoded hydrogenase gene cluster in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **171**(3): 1340-1345.
238. Eitinger, T, Friedrich, B (1991) Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* **266**(5): 3222-3227.
239. Fu, C, Javedan, S, Moshiri, F, Maier, RJ (1994) Bacterial genes involved in incorporation of nickel into a hydrogenase enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5099-5103.
240. Wolfram, L, Eitinger, T, Friedrich, B (1991) Construction and properties of a triprotein containing the high-affinity nickel transporter of *Alcaligenes eutrophus*. *FEBS Lett* **283**(1): 109-112.
241. Wolfram, L, Friedrich, B, Eitinger, T (1995) The *Alcaligenes eutrophus* protein HoxN mediates nickel transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**(7): 1840-1843.
242. Schäfer, C, Friedrich, B, Lenz, O (2013) Characteristics of a novel, oxygen-insensitive group 5 [NiFe]-hydrogenase in *Ralstonia eutropha*. *Appl Environ Microbiol*. **79**(17): 5137-45
243. Burgdorf, T, van der Linden, E, Bernhard, M, Yin, QY, Back, JW, Hartog, AF, Muijsers, AO, de Koster, CG, Albracht, SP, Friedrich, B (2005) The soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J Bacteriol* **187**(9): 3122-3132.
244. Burgdorf, T, De Lacey, AL, Friedrich, B (2002) Functional analysis by site-directed mutagenesis of the NAD⁺-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* **184**(22): 6280-6288.
245. Massanz, C, Friedrich, B (1999) Amino acid replacements at the H₂-activating site of the NAD-reducing hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochemistry* **38**(43): 14330-14337.

246. van der Linden, E, Faber, BW, Bleijlevens, B, Burgdorf, T, Bernhard, M, Friedrich, B, Albracht, SP (2004) Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Eur J Biochem* **271**(4): 801-808.
247. Lauterbach, L, Idris, Z, Vincent, KA, Lenz, O (2011) Catalytic properties of the isolated diaphorase fragment of the NAD-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *PLoS One* **6**(10): e25939.
248. Massanz, C, Schmidt, S, Friedrich, B (1998) Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **180**(5): 1023-1029.
249. Flemming, D, Stolpe, S, Schneider, D, Hellwig, P, Friedrich, T (2005) A possible role for iron-sulfur cluster N2 in proton translocation by the NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Microbiol Biotechnol* **10**(2-4): 208-222.
250. Schneider, K, Cammack, R, Schlegel, HG, Hall, DO (1979) The iron-sulphur centres of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim Biophys Acta* **578**(2): 445-461.
251. Schneider, K, Pinkwart, M, Jochim, K (1983) Purification of hydrogenases by affinity chromatography on Procion Red-agarose. *Biochem J* **213**(2): 391-398.
252. Burgdorf, T, Löscher, S, Liebisch, P, Van der Linden, E, Galander, M, Lendzian, F, Meyer-Klaucke, W, Albracht, SP, Friedrich, B, Dau, H, Haumann, M (2005) Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **127**(2): 576-592.
253. Lauterbach, L, Liu, J, Horch, M, Hummel, P, Schwarze, A, Haumann, M, Vincent, KA, Lenz, O, Zebger, I (2011) The Hydrogenase Subcomplex of the NAD⁺-Reducing [NiFe] Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* – Insights into Catalysis and Redox Interconversions. *Eur Journal Inorg Chem* **2011**(7): 1067-1079.
254. van der Linden, E, Burgdorf, T, Bernhard, M, Bleijlevens, B, Friedrich, B, Albracht, SP (2004) The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J Biol Inorg Chem* **9**(5): 616-626.
255. Horch, M, Lauterbach, L, Lenz, O, Hildebrandt, P, Zebger, I (2011) NAD(H)-coupled hydrogen cycling - structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett* **586**(5): 545-556.
256. Horch, M, Lauterbach, L, Saggi, M, Hildebrandt, P, Lendzian, F, Bittl, R, Lenz, O, Zebger, I (2010) Probing the active site of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**(43): 8026-8029.
257. Horch, M, Rippers, Y, Mrogiński, MA, Hildebrandt, P, Zebger, I (2013) Combining spectroscopy and theory to evaluate structural models of metalloenzymes: a case study on the soluble [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Chemphyschem* **14**(1): 185-191.
258. Goldet, G, Brandmayr, C, Stripp, ST, Happe, T, Cavazza, C, Fontecilla-Camps, JC, Armstrong, FA (2009) Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen: comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects. *J Am Chem Soc* **131**(41): 14979-14989.
259. Stripp, ST, Goldet, G, Brandmayr, C, Sanganas, O, Vincent, KA, Haumann, M, Armstrong, FA, Happe, T (2009) How oxygen attacks [FeFe]-hydrogenases from photosynthetic organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(41): 17331-17336.
260. Liebgott, PP, de Lacey, AL, Burlat, B, Cournac, L, Richaud, P, Brugna, M, Fernandez, VM, Guigliarelli, B, Rousset, M, Leger, C, Dementin, S (2011) Original design of an oxygen-tolerant [NiFe] hydrogenase: major effect of a valine-to-cysteine mutation near the active site. *J Am Chem Soc* **133**(4): 986-997.
261. Liebgott, PP, Leroux, F, Burlat, B, Dementin, S, Baffert, C, Lautier, T, Fourmond, V, Ceccaldi, P, Cavazza, C, Meynial-Salles, I, Soucaille, P, Fontecilla-Camps, JC, Guigliarelli, B, Bertrand, P, Rousset, M, Leger, C (2010) Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. *Nat Chem Biol* **6**(1): 63-70.
262. Le Goff, A, Artero, V, Jousselme, B, Tran, PD, Guillet, N, Metaye, R, Fihri, A, Palacin, S, Fontecave, M (2009) From hydrogenases to noble metal-free catalytic nanomaterials for H₂ production and uptake. *Science* **326**(5958): 1384-1387.
263. Rakowski DuBois, M, DuBois, DL (2009) Development of molecular electrocatalysts for CO₂ reduction and H₂ production/oxidation. *Acc Chem Res* **42**(12): 1974-1982.

264. Friedrich, B, Fritsch, J, Lenz, O (2011) Oxygen-tolerant hydrogenases in hydrogen-based technologies. *Curr Opin Biotechnol* **22**(3): 358-364
265. Nath, K, Kumar, A, Das, D (2005) Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(4): 533-541.
266. Tao, Y, Chen, Y, Wu, Y, He, Y, Zhou, Z (2007) High hydrogen yield from a two step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy* **32**: 200-206.
267. Yokoi, H, Maki, R, Hirose, J, Hayashi, S (2002) Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. *Biomass Bioenergy* **22**: 389-395.
268. Ihara, M, Nishihara, H, Yoon, KS, Lenz, O, Friedrich, B, Nakamoto, H, Kojima, K, Honma, D, Kamachi, T, Okura, I (2006) Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a [NiFe]-hydrogenase and the cyanobacterial photosystem I. *Photochem Photobiol* **82**(3): 676-682.
269. Krassen, H, Schwarze, A, Friedrich, B, Ataka, K, Lenz, O, Heberle, J (2009) Photosynthetic hydrogen production by a hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *ACS Nano* **3**(12): 4055-4061.
270. Schwarze, A, Kopczak, MJ, Rogner, M, Lenz, O (2010) Requirements for construction of a functional hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *Appl Environ Microbiol* **76**(8): 2641-2651.
271. Lubner, CE, Grimme, R, Bryant, DA, Golbeck, JH (2010) Wiring photosystem I for direct solar hydrogen production. *Biochemistry* **49**(3): 404-414.
272. Lubner, CE, Knorzer, P, Silva, PJ, Vincent, KA, Happe, T, Bryant, DA, Golbeck, JH (2010) Wiring an [FeFe]-hydrogenase with photosystem I for light-induced hydrogen production. *Biochemistry* **49**(48): 10264-10266.
273. Inui, M, Suda, M, Kimura, S, Yasuda, K, Suzuki, H, Toda, H, Yamamoto, S, Okino, S, Suzuki, N, Yukawa, H (2008) Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**(6): 1305-1316.
274. Ratzka, J, Lauterbach, L, Lenz, O, Ansorge-Schumacher, MB (2011) Systematic evaluation of the dihydrogen-oxidising and NAD⁺-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 as a cofactor regeneration catalyst. *Biocatalysis and Biotransformation* **29**(6): 246-252.
275. Lauterbach, L, Lenz, O, Vincent, KA (2013) H₂-driven cofactor regeneration with NAD(P)-reducing hydrogenases. *FEBS J* **280**(13): 3058-3068.
276. Ludwig, M, Schwarze, A, Lenz, O (2008) Knallgas unter Kontrolle - O₂-tolerante Hydrogenasen und ihre Anwendung. *BIOspektrum* **5**: 477-479.
277. Vincent, KA, Cracknell, JA, Clark, JR, Ludwig, M, Lenz, O, Friedrich, B, Armstrong, FA (2006) Electricity from low-level H₂ in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase. *Chem Commun (Camb)* **48**: 5033-5035.
278. Wait, AF, Parkin, A, Morley, GM, dos Santos, L, Armstrong, FA (2010) Characteristics of enzyme-based hydrogen fuel cells using an oxygen-tolerant hydrogenase as the anodic catalyst. *J Phys Chem C* **114**: 12003-12009.
279. English, CM, Eckert, C, Brown, K, Seibert, M, King, PW (2009) Recombinant and *in vitro* expression systems for hydrogenases: new frontiers in basic and applied studies for biological and synthetic H₂ production. *Dalton Trans* **45**: 9970-9978.
280. Kim, S, Lu, D, Park, S, Wang, G (2012) Production of hydrogenases as biocatalysts. *International Journal of Hydrogen Energy* **37**: 15833-15840.
281. Ihara, M, Nakamoto, H, Kamachi, T, Okura, I, Maeda, M (2006) Photoinduced hydrogen production by direct electron transfer from photosystem I cross-linked with cytochrome c₃ to [NiFe]-hydrogenase. *Photochem Photobiol* **82**(6): 1677-1685.
282. Lenz, O, Gleiche, A, Strack, A, Friedrich, B (2005) Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J Bacteriol* **187**(18): 6590-6595.
283. Porthun, A, Bernhard, M, Friedrich, B (2002) Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch Microbiol* **177**(2): 159-166.

284. Rousset, M, Magro, V, Forget, N, Guigliarelli, B, Belaich, JP, Hatchikian, EC (1998) Heterologous expression of the *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans* MR400. *J Bacteriol* **180**(18): 4982-4986.
285. Kim, JY, Jo, BH, Cha, HJ (2010) Production of biohydrogen by recombinant expression of [NiFe]-hydrogenase 1 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **9**: e54.
286. Sun, J, Hopkins, RC, Jenney, FE, McTernan, PM, Adams, MW (2010) Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. *PLoS One* **5**(5): e10526.
287. Wells, MA, Mercer, J, Mott, RA, Pereira-Medrano, AG, Burja, AM, Radianingtyas, H, Wright, PC (2011) Engineering a non-native hydrogen production pathway into *Escherichia coli* via a cyanobacterial [NiFe] hydrogenase. *Metab Eng* **13**(4): 445-453.
288. Weyman, PD, Vargas, WA, Chuang, RY, Chang, Y, Smith, HO, Xu, Q (2011) Heterologous expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Microbiology* **157**(5): 1363-1374.
289. Weyman, PD, Vargas, WA, Tong, Y, Yu, J, Maness, PC, Smith, HO, Xu, Q (2011) Heterologous Expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe]-Hydrogenases in *Synechococcus elongatus*. *PLoS One* **6**(5): e20126.
290. Erkens, A, Schneider, K, Müller, A (1996) The NAD-linked soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16: detection and characterization of EPR signals deriving from nickel and flavin. *JBIC* **1**: 99-110.
291. Hyman, MR, Fox, CA, Arp, DJ (1988) Role of hydrogen in the activation and regulation of hydrogen oxidation by the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem J* **254**(2): 463-468.
292. Keefe, RG, Axley, MJ, Harabin, AL (1995) Kinetic mechanism studies of the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch Biochem Biophys* **317**(2): 449-456.
293. Petrov, RR, Utkin, IB, Popov, VO (1989) Redox-dependent inactivation of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1. *Arch Biochem Biophys* **268**(1): 298-305.
294. Petrov, RR, Utkin, IB, Popov, VO (1989) Effect of redox potential on the activation of the NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1. *Arch Biochem Biophys* **268**(1): 287-297.
295. Popov, VO, Ovchinnikov, AN, Egorov, AM, Berezin, IV (1986) NAD⁺-dependent hydrogenase from the hydrogen oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* Z1. Stabilization against temperature and urea induced inactivation. *Biochimie* **68**(1): 63-68.
296. Schlesier, M, Friedrich, B (1981) *In vivo* inactivation of soluble hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *Arch Microbiol* **129**(2): 150-153.
297. Schneider, K, Piechulla, B (1986) Isolation and immunological characterization of the four non-identical subunits of the soluble NAD-linked hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochimie* **68**(1): 5-13.
298. Schneider, K, Schlegel, HG (1981) Production of superoxide radicals by soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem J* **193**(1): 99-107.
299. Utkin, IB, Petrov, RR, Egorov, AM, Popov, VO, Berezin, IV (1987) NAD-dependent hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* Z1: does it have a regulatory centre? *Biochem Biophys Res Commun* **142**(2): 297-301.
300. Subramaniam, S (1998) The Biology Workbench - a seamless database and analysis environment for the biologist. *Proteins* **32**(1): 1-2.
301. Girish, V, Vijayalakshmi, A (2004) Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer* **41**(1): 47.
302. Schneider, CA, Rasband, WS, Eliceiri, KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**(7): 671-675.
303. Inoue, H, Nojima, H, Okayama, H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(23-28).
304. Selmer, T, Pinkenburg, O (2008) Method of cloning at least one nucleic acid molecule of interest using type IIS restriction endonucleases, and corresponding cloning vectors, kits and system using type IIS restriction endonucleases. Patent Nr. WO/2008/095927 A1.

305. **Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989)** Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edition; Ford N, Nolan C, Ferguson M (Editors). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
306. **Bradford, MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
307. **Laemmli, UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
308. **Camacho-Carvajal, MM, Wollscheid, B, Aebersold, R, Steimle, V, Schamel, WW (2004)** Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates. *Mol Cell Proteomics* **3**(2): 176-182.
309. **Wilson, CM (1979)** Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **96**(2): 263-278.
310. **Blum, H, Beier, H, Gross, HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
311. **Heukeskoven, J, Dernick, R (1985)** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112.
312. **Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.
313. **Schelden, M (2013)** Entwicklung eines zellfreien Systems zur *in vitro*-Produktion von Hyp-Reifungsfaktoren der löslichen [NiFe]-Hydrogenase aus *Cupriavidus necator*. Bachelorarbeit (Jülich): FH Aachen.
314. **Pierik, AJ, Wolbert, RB, Mutsaers, PH, Hagen, WR, Veeger, C (1992)** Purification and biochemical characterization of a putative [6Fe-6S] prismatic-cluster-containing protein from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur J Biochem* **206**(3): 697-704.
315. **McKenna, CE, Gutheil, WG, Song, W (1991)** A method for preparing analytically pure sodium dithionite. Dithionite quality and observed nitrogenase-specific activities. *Biochim Biophys Acta* **1075**(1): 109-117.
316. **Wolf, I, Buhrke, T, Dornedde, J, Pohlmann, A, Friedrich, B (1998)** Duplication of *hyp* genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Arch Microbiol* **170**(6): 451-459.
317. **Eitinger, T, Friedrich, B (1994)** A topological model for the high-affinity nickel transporter of *Alcaligenes eutrophus*. *Mol Microbiol* **12**(6): 1025-1032.
318. **Eitinger, T, Wolfram, L, Degen, O, Anthon, C (1997)** A Ni²⁺ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. *J Biol Chem* **272**(27): 17139-17144.
319. **Tolia, NH, Joshua-Tor, L (2006)** Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat Methods* **3**(1): 55-64.
320. **Korpimäki, T, Kurittu, J, Karp, M (2003)** Surprisingly fast disappearance of beta-lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *J Microbiol Methods* **53**(1): 37-42.
321. **Studier, FW (2005)** Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**(1): 207-234.
322. **Kim, JY, Jo, BH, Cha, HJ (2011)** Production of biohydrogen by heterologous expression of oxygen-tolerant *Hydrogenovibrio marinus* [NiFe]-hydrogenase in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **155**(3): 312-319.
323. **Pfützner, J, Linke, HA, Schlegel, HG (1970)** Eigenschaften der NAD-spezifischen Hydrogenase aus *Hydrogenomonas* H 16. *Arch Mikrobiol* **71**(1): 67-78.
324. **Hyman, MR, Arp, DJ (1988)** Reversible and irreversible effects of nitric oxide on the soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochem J* **254**(2): 469-475.
325. **Tikhonova, TV, Savell'eva, ND, Popov, VO (2003)** Chemical modification of catalytically essential functional groups of NAD-dependent hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Biochemistry (Mosc)* **68**(9): 994-1001.

326. Löscher, S, Burgdorf, T, Buhrke, T, Friedrich, B, Dau, H, Haumann, M (2005) Non-standard structures of the Ni-Fe cofactor in the regulatory and the NAD-reducing hydrogenases from *Ralstonia eutropha*. *Biochem Soc Trans* **33**(1): 25-27.
327. Tikhonova, TV, Kurkin, SA, Klyachko, NL, Popov, VO (2005) Use of a reverse micelle system for study of oligomeric structure of NAD⁺-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Biochemistry (Mosc)* **70**(6): 645-651.
328. Löscher, S, Burgdorf, T, Zebger, I, Hildebrandt, P, Dau, H, Friedrich, B, Haumann, M (2006) Bias from H₂ cleavage to production and coordination changes at the Ni-Fe active site in the NAD⁺-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry* **45**(38): 11658-11665.
329. Braun, M, Bungert, S, Friedrich, T (1998) Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**(7): 1861-1867.
330. Ragan, CI, Galante, YM, Hatefi, Y, Ohnishi, T (1982) Resolution of mitochondrial NADH dehydrogenase and isolation of two iron-sulfur proteins. *Biochemistry* **21**(3): 590-594.
331. Sweeney, WV, Rabinowitz, JC (1980) Proteins containing 4Fe-4S clusters: an overview. *Annu Rev Biochem* **49**: 139-161.
332. Kohlstädt, M, Dörner, K, Labatzke, R, Koc, C, Hielscher, R, Schiltz, E, Einsle, O, Hellwig, P, Friedrich, T (2008) Heterologous Production, Isolation, Characterization and Crystallization of a Soluble Fragment of the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry* **47**(49): 13036-13045.
333. Zhao, T, Cruz, F, Ferry, JG (2001) Iron-sulfur flavoprotein (Isf) from *Methanosarcina thermophila* is the prototype of a widely distributed family. *J Bacteriol* **183**(21): 6225-6233.
334. Tran-Betcke, A, Warnecke, U, Bocker, C, Zaborosch, C, Friedrich, B (1990) Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* **172**(6): 2920-2929.
335. Hernando, Y, Palacios, JM, Imperial, J, Ruiz-Argueso, T (1995) The *hypBFCDE* operon from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is expressed from an Fnr-type promoter that escapes mutagenesis of the *fnrN* gene. *J Bacteriol* **177**(19): 5661-5669.
336. Olson, JW, Maier, RJ (1997) The sequences of *hypF*, *hypC* and *hypD* complete the *hyp* gene cluster required for hydrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Gene* **199**(1-2): 93-99.
337. Blokesch, M (2004) [NiFe]-Hydrogenasen von *Escherichia coli*: Funktionen der am Metalleinbau beteiligten Proteine. Dissertation: LMU München.
338. Adman, ET, Sicker, LC, Jensen, LH (1973) Structure of a bacterial ferredoxin. *J Biol Chem* **248**(11): 3987-3996.
339. Gibney, BR, Mulholland, SE, Rabanal, F, Dutton, PL (1996) Ferredoxin and ferredoxin-heme maquettes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(26): 15041-15046.
340. Lenz, O, Schwartz, E, DERNEDDE, J, EITINGER, M, FRIEDRICH, B (1994) The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J Bacteriol* **176**(14): 4385-4393.
341. Buhrke, T, Bleijlevens, B, Albracht, SP, Friedrich, B (2001) Involvement of *hyp* gene products in maturation of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* **183**(24): 7087-7093.
342. Ludwig, M, Schubert, T, Zebger, I, Wisitruangsakul, N, Saggi, M, Strack, A, Lenz, O, Hildebrandt, P, Friedrich, B (2009) Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J Biol Chem* **284**(4): 2159-2168.
343. Boyer, ME, Stapleton, JA, Kuchenreuther, JM, Wang, CW, Swartz, JR (2008) Cell-free synthesis and maturation of [FeFe] hydrogenases. *Biotechnol Bioeng* **99**(1): 59-67.
344. Kuchenreuther, JM, Britt, RD, Swartz, JR (2012) New insights into [FeFe] hydrogenase activation and maturase function. *PLoS One* **7**(9): e45850.
345. McGlynn, SE, Ruebush, SS, Naumov, A, Nagy, LE, Dubini, A, King, PW, Broderick, JB, Posewitz, MC, Peters, JW (2007) In vitro activation of [FeFe] hydrogenase: new insights into hydrogenase maturation. *J Biol Inorg Chem* **12**(4): 443-447.

346. Soboh, B, Kruger, S, Kuhns, M, Pinske, C, Lehmann, A, Sawers, RG (2010) Development of a cell-free system reveals an oxygen-labile step in the maturation of [NiFe]-hydrogenase 2 of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **584**(18): 4109-4114.
347. Fu, C, Olson, JW, Maier, RJ (1995) HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 2333-2337.
348. Leach, MR, Zhang, JW, Zamble, DB (2007) The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* **282**(22): 16177-16186.
349. Xia, W, Li, H, Yang, X, Wong, KB, Sun, H (2011) Metallo-GTPase HypB from *Helicobacter pylori* and Its Interaction with Nickel Chaperone Protein HypA. *J Biol Chem* **287**(9): 6753-6763
350. Karyakin, AA, Morozov, SV, Karyakina, EE, Zorin, NA, Pereygin, VV, Cosnier, S (2005) Hydrogenase electrodes for fuel cells. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 73-75.
351. Vincent, KA, Cracknell, JA, Lenz, O, Zebger, I, Friedrich, B, Armstrong, FA (2005) Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47): 16951-16954.
352. Lutz, BJ, Fan, ZH, Burgdorf, T, Friedrich, B (2005) Hydrogen sensing by enzyme-catalyzed electrochemical detection. *Anal Chem* **77**(15): 4969-4975.
353. Qian, DJ, Nakamura, C, Wenk, SO, Ishikawa, H, Zorin, N, Miyake, J (2002) A hydrogen biosensor made of clay, poly(butylviologen), and hydrogenase sandwiched on a glass carbon electrode. *Biosens Bioelectron* **17**(9): 789-796.
354. Walhout, AJ, Temple, GF, Brasch, MA, Hartley, JL, Lorson, MA, van den Heuvel, S, Vidal, M (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* **328**: 575-592.
355. Beck, R, Burtscher, H (1994) Introduction of arbitrary sequences into genes by use of class II restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **22**(5): 886-887.
356. Lebedenko, EN, Birikh, KR, Plutalov, OV, Berlin Yu, A (1991) Method of artificial DNA splicing by directed ligation (SDL). *Nucleic Acids Res* **19**(24): 6757-6761.
357. Rauhut, R, Klug, G (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**(3): 353-370.
358. Regnier, P, Arraiano, CM (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* **22**(3): 235-244.
359. Kim, KJ, Kim, HE, Lee, KH, Han, W, Yi, MJ, Jeong, J, Oh, BH (2004) Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein complexes. *Protein Sci* **13**(6): 1698-1703.
360. Rucker, P, Torti, FM, Torti, SV (1997) Recombinant ferritin: modulation of subunit stoichiometry in bacterial expression systems. *Protein Eng* **10**(8): 967-973.
361. Humphreys, DP, Carrington, B, Bowering, LC, Ganesh, R, Sehdev, M, Smith, BJ, King, LM, Reeks, DG, Lawson, A, Popplewell, AG (2002) A plasmid system for optimization of Fab' production in *Escherichia coli*: importance of balance of heavy chain and light chain synthesis. *Protein Expr Purif* **26**(2): 309-320.
362. McNally, EM, Goodwin, EB, Spudich, JA, Leinwand, LA (1988) Coexpression and assembly of myosin heavy chain and myosin light chain in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7270-7273.
363. Hunt, AG, Maiti, IB (2001) Strategies for expressing multiple foreign genes in plants as polycistronic constructs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* **37**(3): 313-320.
364. Mozes-Koch, R, Gover, O, Tanne, E, Peretz, Y, Maori, E, Chernin, L, Sela, I (2012) Expression of an entire bacterial operon in plants. *Plant Physiol* **158**(4): 1883-1892.
365. Nielsen, DR, Leonard, E, Yoon, SH, Tseng, HC, Yuan, C, Prather, KL (2009) Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab Eng* **11**(4-5): 262-273.
366. Scheich, C, Kummel, D, Soumailakakis, D, Heinemann, U, Bussow, K (2007) Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Res* **35**(6): e43.
367. Tan, S (2001) A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **21**(1): 224-234.

368. **Tan, S, Kern, RC, Selleck, W (2005)** The pST44 polycistronic expression system for producing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **40**(2): 385-395.
369. **Held, D, Yaeger, K, Novy, R (2003)** New coexpression vectors for expanded compatibilities in *E. coli*. *inNovations* **18**: 4-6.
370. **Khalil, AS, Collins, JJ (2010)** Synthetic biology: applications come of age. *Nat Rev Genet* **11**(5): 367-379.
371. **Otero, JM, Nielsen, J (2010)** Industrial systems biology. *Biotechnol Bioeng* **105**(3): 439-460.
372. **Yadav, VG, De Mey, M, Lim, CG, Ajikumar, PK, Stephanopoulos, G (2012)** The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metab Eng* **14**(3): 233-241.
373. **Aslanidis, C, de Jong, PJ, Schmitz, G (1994)** Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods Appl* **4**(3): 172-177.
374. **Tachibana, A, Tohiguchi, K, Ueno, T, Setogawa, Y, Harada, A, Tanabe, T (2009)** Preparation of long sticky ends for universal ligation-independent cloning: sequential T4 DNA polymerase treatments. *J Biosci Bioeng* **107**(6): 668-669.
375. **Li, C, Wen, A, Shen, B, Lu, J, Huang, Y, Chang, Y (2011)** FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnol* **11**: 92.
376. **Li, MZ, Elledge, SJ (2007)** Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* **4**(3): 251-256.
377. **Quan, J, Tian, J (2009)** Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One* **4**(7): e6441.
378. **Alexandrov, A, Vignali, M, LaCount, DJ, Quartley, E, de Vries, C, De Rosa, D, Babulski, J, Mitchell, SF, Schoenfeld, LW, Fields, S, Hol, WG, Dumont, ME, Phizicky, EM, Grayhack, EJ (2004)** A facile method for high-throughput co-expression of protein pairs. *Mol Cell Proteomics* **3**(9): 934-938.
379. **Chanda, PK, Edris, WA, Kennedy, JD (2006)** A set of ligation-independent expression vectors for co-expression of proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **47**(1): 217-224.
380. **Berrow, NS, Alderton, D, Owens, RJ (2009)** The precise engineering of expression vectors using high-throughput In-Fusion PCR cloning. *Methods Mol Biol* **498**: 75-90.
381. **Berrow, NS, Alderton, D, Sainsbury, S, Nettleship, J, Assenberg, R, Rahman, N, Stuart, DI, Owens, RJ (2007)** A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Res* **35**(6): e45.
382. **Zhu, B, Cai, G, Hall, EO, Freeman, GJ (2007)** In-fusion assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *Biotechniques* **43**(3): 354-359.
383. **Berger, I, Fitzgerald, DJ, Richmond, TJ (2004)** Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol* **22**(12): 1583-1587.
384. **Bieniossek, C, Nie, Y, Frey, D, Olieric, N, Schaffitzel, C, Collinson, I, Romier, C, Berger, P, Richmond, TJ, Steinmetz, MO, Berger, I (2009)** Automated unrestricted multigene recombineering for multiprotein complex production. *Nat Methods* **6**(6): 447-450.
385. **Fitzgerald, DJ, Berger, P, Schaffitzel, C, Yamada, K, Richmond, TJ, Berger, I (2006)** Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nat Methods* **3**(12): 1021-1032.
386. **Gonzalez-Flecha, B, Demple, B (1995)** Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**(23): 13681-13687.
387. **Tanaka, K, Ishizaki, A, Kanamaru, T, Kawano, T (1995)** Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol Bioeng* **45**(3): 268-275.
388. **Tsuge, T, Tanaka, K, Ishizaki, A (2001)** Development of a novel method for feeding a mixture of L-lactic acid and acetic acid in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for poly-D-3-hydroxybutyrate production. *J Biosci Bioeng* **91**(6): 545-550.
389. **Schlegel, HG, Kaltwasser, H, Gottschalk, G (1961)** A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Arch Mikrobiol* **38**: 209-222.

390. Asada, Y, Koike, Y, Schnackenberg, J, Miyake, M, Uemura, I, Miyake, J (2000) Heterologous expression of clostridial hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochim Biophys Acta* **1490**(3): 269-278.
391. Bascones, E, Imperial, J, Ruiz-Argueso, T, Palacios, JM (2000) Generation of new hydrogen-recycling *Rhizobiaceae* strains by introduction of a novel *hup* minitransposon. *Appl Environ Microbiol* **66**(10): 4292-4299.
392. Li, C, Schwabe, JW, Banayo, E, Evans, RM (1997) Coexpression of nuclear receptor partners increases their solubility and biological activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(6): 2278-2283.
393. Wang, H, Chong, S (2003) Visualization of coupled protein folding and binding in bacteria and purification of the heterodimeric complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 478-483.
394. Yang, W, Zhang, L, Lu, Z, Tao, W, Zhai, Z (2001) A new method for protein coexpression in *Escherichia coli* using two incompatible plasmids. *Protein Expr Purif* **22**(3): 472-478.
395. Stebbins, CE, Kaelin, WG, Jr., Pavletich, NP (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* **284**(5413): 455-461.
396. Bross, P, Andresen, BS, Winter, V, Krautle, F, Jensen, TG, Nandy, A, Kolvraa, S, Ghisla, S, Bolund, L, Gregersen, N (1993) Co-overexpression of bacterial GroESL chaperonins partly overcomes non-productive folding and tetramer assembly of *E. coli*-expressed human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) carrying the prevalent disease-causing K304E mutation. *Biochim Biophys Acta* **1182**(3): 264-274.
397. Haase-Pettingell, CA, King, J (1988) Formation of aggregates from a thermolabile *in vivo* folding intermediate in P22 tailspike maturation. A model for inclusion body formation. *J Biol Chem* **263**(10): 4977-4983.
398. San-Miguel, T, Perez-Bermudez, P, Gavidia, I (2013) Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *Springerplus* **2**(1): 89.
399. Schein, C, Noteborn, MHM (1988) Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nat Biotechnol* **6**: 291-294.
400. Sorensen, HP, Mortensen, KK (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **4**(1): 1.
401. Sorensen, HP, Mortensen, KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **115**(2): 113-128.
402. Wetzel, R (1994) Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends Biotechnol* **12**(5): 193-198.
403. Wick, LM, Egli, T (2004) Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**: 1-45.
404. Blommel, PG, Becker, KJ, Duvnjak, P, Fox, BG (2007) Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition. *Biotechnol Prog* **23**(3): 585-598.
405. Grossman, TH, Kawasaki, ES, Punreddy, SR, Osburne, MS (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* **209**(1-2): 95-103.
406. Deacon, SE, Roach, PC, Postis, VL, Wright, GS, Xia, X, Phillips, SE, Knox, JP, Henderson, PJ, McPherson, MJ, Baldwin, SA (2008) Reliable scale-up of membrane protein over-expression by bacterial auto-induction: from microwell plates to pilot scale fermentations. *Mol Membr Biol* **25**(8): 588-598.
407. Inada, T, Kimata, K, Aiba, H (1996) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* **1**(3): 293-301.
408. Kimata, K, Takahashi, H, Inada, T, Postma, P, Aiba, H (1997) cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 12914-12919.
409. Loomis, WF, Jr., Magasanik, B (1967) Glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **93**(4): 1397-1401.
410. Eppler, T, Postma, P, Schutz, A, Volker, U, Boos, W (2002) Glycerol-3-phosphate-induced catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**(11): 3044-3052.

411. **el-Mansi, EM, Holms, WH (1989)** Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol* **135**(11): 2875-2883.
412. **el-Mansi, M (2004)** Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**(7): 295-300.
413. **Han, K, Lim, HC, Hong, J (1992)** Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng* **39**(6): 663-671.
414. **Veit, A, Polen, T, Wendisch, VF (2007)** Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**(2): 406-421.
415. **Xu, B, Jahic, M, Blomsten, G, Enfors, SO (1999)** Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(5): 564-571.
416. **Wolfe, AJ (2005)** The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(1): 12-50.
417. **Iuchi, S, Cameron, DC, Lin, EC (1989)** A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**(2): 868-873.
418. **Iuchi, S, Lin, EC (1988)** *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(6): 1888-1892.
419. **Lin, H, Bennett, GN, San, KY (2005)** Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng* **7**(2): 116-127.
420. **Dharmadi, Y, Murarka, A, Gonzalez, R (2006)** Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* **94**(5): 821-829.
421. **Lengeler, JW, Drews, G, Schlegel, HG (1999)** Biology of the Prokaryotes. Stuttgart: Thieme.
422. **Ou, J, Wang, L, Ding, X, Du, J, Zhang, Y, Chen, H, Xu, A (2004)** Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **314**(1): 174-180.
423. **Lukey, MJ, Parkin, A, Roessler, MM, Murphy, BJ, Harmer, J, Palmer, T, Sargent, F, Armstrong, FA (2010)** How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions. *J Biol Chem* **285**(6): 3928-3938.
424. **Trchounian, K (2012)** Transcriptional control of hydrogen production during mixed carbon fermentation by hydrogenases 4 (*hyf*) and 3 (*hyc*) in *Escherichia coli*. *Gene* **506**(1): 156-160.
425. **Lutz, S, Bohm, R, Beier, A, Böck, A (1990)** Characterization of divergent NtrA-dependent promoters in the anaerobically expressed gene cluster coding for hydrogenase 3 components of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**(1): 13-20.
426. **Brondsted, L, Atlung, T (1994)** Anaerobic regulation of the hydrogenase 1 (*hya*) operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**(17): 5423-5428.
427. **Richard, DJ, Sawers, G, Sargent, F, McWalter, L, Boxer, DH (1999)** Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiology* **145**(Pt 10): 2903-2912.
428. **Alexeeva, S, Hellingwerf, KJ, Teixeira de Mattos, MJ (2003)** Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J Bacteriol* **185**(1): 204-209.
429. **Messenger, SL, Green, J (2003)** FNR-mediated regulation of *hyp* expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **228**(1): 81-86.
430. **Pinske, C, Bonn, M, Kruger, S, Lindenstrauss, U, Sawers, RG (2011)** Metabolic deficiencies revealed in the biotechnologically important model bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). *PLoS One* **6**(8): e22830.
431. **Hausinger, RP (1987)** Nickel utilization by microorganisms. *Microbiol Rev* **51**(1): 22-42.
432. **Wu, LF, Mandrand-Berthelot, MA, Waugh, R, Edmonds, CJ, Holt, SE, Boxer, DH (1989)** Nickel deficiency gives rise to the defective hydrogenase phenotype of *hydC* and *fnr* mutants in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**(12): 1709-1718.

433. **Kärst, U, Suetin, S, Friedrich, CG (1987)** Purification and properties of a protein linked to the soluble hydrogenase of hydrogen-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* **169**(5): 2079-2085.
434. **Constant, P, Chowdhury, SP, Hesse, L, Pratscher, J, Conrad, R (2011)** Genome data mining and soil survey for the novel group 5 [NiFe]-hydrogenase to explore the diversity and ecological importance of presumptive high-affinity H₂-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **77**(17): 6027-6035.
435. **Constant, P, Chowdhury, SP, Pratscher, J, Conrad, R (2010)** Streptomyces contributing to atmospheric molecular hydrogen soil uptake are widespread and encode a putative high-affinity [NiFe]-hydrogenase. *Environ Microbiol* **12**(3): 821-829.
436. **Constant, P, Poissant, L, Villemur, R (2008)** Isolation of *Streptomyces* sp. PCB7, the first microorganism demonstrating high-affinity uptake of tropospheric H₂. *ISME J* **2**(10): 1066-1076.
437. **Chan, KH, Lee, KM, Wong, KB (2012)** Interaction between hydrogenase maturation factors HypA and HypB is required for [NiFe]-hydrogenase maturation. *PLoS One* **7**(2): e32592.
438. **Cheng, T, Li, H, Xia, W, Sun, H (2011)** Multifaceted SlyD from *Helicobacter pylori*: implication in [NiFe]-hydrogenase maturation. *J Biol Inorg Chem*.
439. **Chung, KC, Zamble, DB (2010)** The *Escherichia coli* metal-binding chaperone SlyD interacts with the large subunit of [NiFe]-hydrogenase 3. *FEBS Lett* **585**(2): 291-294.
440. **Kaluarachchi, H, Zhang, JW, Zamble, DB (2011)** *Escherichia coli* SlyD, More Than a Ni(II) Reservoir. *Biochemistry* **50**(50): 10761-10763.
441. **Zhang, JW, Butland, G, Greenblatt, JF, Emili, A, Zamble, DB (2005)** A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **280**(6): 4360-4366.
442. **Olson, JW, Fu, C, Maier, RJ (1997)** The HypB protein from *Bradyrhizobium japonicum* can store nickel and is required for the nickel-dependent transcriptional regulation of hydrogenase. *Mol Microbiol* **24**(1): 119-128.
443. **Olson, JW, Mehta, NS, Maier, RJ (2001)** Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **39**(1): 176-182.
444. **Waugh, R, Boxer, DH (1986)** Pleiotropic hydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12: growth in the presence of nickel can restore hydrogenase activity. *Biochimie* **68**(1): 157-166.
445. **Khan, AA, Kim, SJ, Paine, DD, Cerniglia, CE (2002)** Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**(Pt 6): 1997-2002.
446. **Bürstel, I (2013)** Die pleiotrope Maturation der sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia eutropha*. Dissertation (Berlin): Humboldt-Universität Berlin.
447. **Siebert, E, Horch, M, Rippers, Y, Fritsch, J, Frielingsdorf, S, Lenz, O, Velazquez Escobar, F, Siebert, F, Paasche, L, Kuhlmann, U, Lenzian, F, Mroginski, MA, Zebger, I, Hildebrandt, P (2013)** Resonance Raman spectroscopy as a tool to monitor the active site of hydrogenases. *Angew Chem Int Ed Engl* **52**(19): 5162-5165.

VI ANHANG

Tabelle VI.1 – Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer und Oligos.

Locus/ Matrize	Gen / Fragment	Primer	Sequenz
Primer für Amplifikation des pF-Rückgrats (Blunt-Ligation) sowie Sequenzierungsprimer (SQ)			
pFF.rbs3a	pF RG linear	pFF-(for) pFF-(rev)	GGAAGAGCTCCAAAGGCGG TGAAGAGCTGGCACTTTTCGG
Sequenzierungs- Primer		SQ-360	GGGTTATTGTCTCATGAGCG
		SQ-361	GAGCGTCGATTTTGTGATGC
Primer für Amplifikation der <i>Cn</i> Gene und Fragmente			
PHG088 Fr. 1	<i>hoxF</i>	PHG088.1 s	ATGGATAGTCGTATCACGACAATAC
		PHG088.1 as	AAGCTGTCGCTCCAGATAATCCTTGAG
PHG088 Fr. 2		PHG088.2 s	CTTCAGGAACCTCGGGAGGACGGG
		PHG088.2 as	CCCTCATCTTGTACCTCTTCCAGATCCTTCAG
PHG089 Fr. 1	<i>hoxU</i>	PHG089.1 s	ATGAGCATTCAAATTACGATCGACGGCAAG
		PHG089N.1 as	TTTTCTCGCAACTCGGGCAGTTGTG
PHG089 Fr. 2		PHG089N.2 s	AAAGCGGCCGTTGCCAGTTGCAG
		PHG089.2 as	CCCTCATTTGTCTTCTCCTTCCAGCGCGCG
PHG090 Fr. 1	<i>hoxY</i>	PHG090.1 s	ATGAGAGCCCCCACAAGACG
		PHG090.1 as	CTCCACCTTCCACGAAGCCGATC
PHG090 Fr. 2		PHG090.2 s	GAGTCTCGAGCGAGGAGAACATCG
		PHG090.2 as	CCCTCAATCGTAGCGATTGATCGAGCTCG
PHG091	<i>hoxH</i>	PHG091 s	ATGAGCAGAAAACCTGGTTATCGACCCGGTG
		PHG091 as	CCCTCAGCGGGCGCGTTCATCGATC
PHG093	<i>hoxI</i>	PHG093 s	ATGAAAGAGCAGGAAATCGACAGG
		PHG093 asN	CCCTAACCTCGTCCTCTACCACCCGTCGAGATGTACTCTTGC
PHG015	<i>hypC1</i>	PHG015 s	ATGTGCCTAGCGATTCCCGC
		PHG015N as	CCCTGCCGGCTCCTGATGAATGTTC
PHG016	<i>hypD1</i>	PHG016 s	ATGAAATACATCGAAGAATTCGCGACGGC
		PHG016 as	CCCTCATGCTGCCACCAAGGGGATATC
PHG017	<i>hypE1</i>	PHG017 s	ATGAGCGGCACCGTTAAACTGGGC
		PHG017 as	CCCTCAACAAATGCGCGGAAGCTGCTCG
PHG018 Fr. 1	<i>hypX</i>	PHG018.1 s	ATGCGCATATTGCTCCTCACCCATAGC
		PHG018.1 as	ATCTCGAACGATCGCCAGTCCAG
PHG018 Fr. 2		PHG018.2 s	GATGAACGAAGTTGGGGTGTGACGGTG
		PHG018.2 as	AAATCCTCTCCCCCAGCAGCAC
PHG018 Fr. 3		PHG018.3 s	TTTTTTCAGCAATGGTATTCATCTGCACCAAATCG
		PHG018.3 as	CCCTCAAGATCGTTCCCCGCAAGTGC
PHG023 Fr. 1	<i>hoxN1</i>	PHG023.1 s	ATGTTCCAATTGCTCGCTGGCGTAGC
		PHG023.1 as	TTCAATGCCACCGACGATGAGGGC
PHG023 Fr. 2		PHG023.2 s	GAAACGCTTGGCCTCCTGGCC
		PHG023.2 as	CCCTCAGGCACGCACTTCGCTGTC
PHG070		PHG070 s	ATGAGCGGCATCCTGGTCGC
		PHG070 as	CCCTACGCCGGCCGTCCATACAATTG
PHG072 Fr. 1	<i>hypF3</i>	PHG072.1 s	ATGCGAGGAATGGTACAAGGAGTAGGATTCCGGCCCACCGTATGGCG
		PHG072.1 as	CAACCCACATTGCGCCGCGGTC
PHG072 Fr. 2		PHG072.2 s	TTGCTGCAAAGCCCGGCGGC
		PHG072.2 as	AGCAGGCCAGCCGCGTGAAG
PHG072 Fr. 3		PHG072.3 s	GCTTCAAGCCCGTGGGGATGC
		PHG072.3 as	CCCCTAGGCACATGTTGTACTCCGATAGCCC
PHG073	<i>hypC2</i>	PHG073 s	ATGTGCCTAGGTATCCCCGGACAGATCC
		PHG073N as	CCCTGGTGGTGCTGGTGACCCGCGCGCATCTCGTC
PHG075	<i>hypD2</i>	PHG075 s	ATGAAGTACGTCGACGAATTCCGCGATCCC
		PHG075 as	CCCTCATTCATGGCCGGCTCCGGC
PHG076 Fr. 1	<i>hypE2</i>	PHG076.1 s	ATGAATGACCGTGTTCGGTCCCG
		PHG076.1 as	ACATCTCCCGCACGCGCATG
PHG076 Fr. 2		PHG076.2 s	TGTGGTTCTCGTCAATGGCTATCTTGGCGAC

		PHG076.2 as	CCCTCAGCAGATCCGCGGCAGCTG
PHG077	hypA3	PHG077 s	ATGCACGAAGTAAGTATCGCGAACAGCGTGG
		PHG077 as	CCCTCACGCCACCTCCATGCGCC
PHG078	hypB3	PHG078 s	ATGTGCACGACTTGCGGTTGCG
		PHG078 as	CCCTCACGCCGGAACGAGTCCTCAG
PHG092	hoxW	PHG092 s	ATGAACGCGCCCCTGAGTTTC
		PHG092 as	CCCTCACGAGGTTTGACGCTCGGC
PHG094 Fr. 1	hypA2	PHG094.1 s	ATGCATGAGATGTCGCTGGCCG
		PHG094.1 as	TTCGCTGCAGTGCAGGCACC
PHG094.2 s		GAAACGGTGGCGATCGGAGCG	
PHG094.2 as		CCCTCACGCCACTTCCAGATCCATGACG	
PHG095 Fr. 1	hypB2	PHG095.1 s	ATGTGCACCAACTGTGGCTGC
		PHG095.1 as	TACGAAGTTCAGCGCAACACGC
PHG095.2 s		GTATCGAGCCCCGGCTCCGG	
PHG095.2 as		CCCCTACACCTTGAGCGCCGCCAGTTG	
PHG096 Fr. 1	hypF2	PHG096.1 s	ATGCTGATGCCGCGCCGTCC
		PHG096.1 as	TTCGGCGATCGGATCAACGTCCTCGAC
PHG096.2 s		GAAACGGTGGCGCGCCTGCAG	
PHG096.2 as		TACGAAGGCCTCGTCGCCGC	
PHG096.3 s		GTA	TCTCAGCATGTGGGCGATCTCGGC
PHG096.3 as		CCCTCAATTTGGTGCTCGTTGCAGCGCCACCCAGACCTG	

Primer für Konstruktion der kompatiblen Expressionsplasmide

pACYCDuet-1	p15Aori	p15Aori-s	AACGTCTCACGAGCATTTTCGCCAAAAGTTGGCC
		lacI-as	AACGTCTCAGCAGTCTGTCACTGAAGCTTGCACGCAATTAATGT AAGTTAG
	Cam ^R -1	T7term-s	AACGTCTCAGCACTCTGTCACTGAAGCTTCTGAGCAATAACTAGCAT AACCCCTTGG
		CamR-as1	AACGTCTCATCGCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTC
	Cam ^R -2	CamR-s2	AACGTCTCAGCGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTAGG
		CamR-as2	AACGTCTCACTCGAGGACGTTGATCGGCACGTAAG
	T7term	T7term-s	AACGTCTCAGCACTCTGTCACTGAAGCTTCTGAGCAATAACTAGCAT AACCCCTTGG
		T7term-as	AACGTCTCAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATG
pCDFDuet-1	CDF ori	CDFori-s	AACGTCTCCGAGAGCTACGCTCCGGGCGTGAGACTGC
		lacI-as	AACGTCTCAGCAGTCTGTCACTGAAGCTTGCACGCAATTAATGT AAGTTAG
	Sm ^R -T7term	T7term-s	AACGTCTCAGCACTCTGTCACTGAAGCTTCTGAGCAATAACTAGCAT AACCCCTTGG
		SmR-as	AACGTCTCCCTCGAGGGAGCGTAGCGACCGAGTGAG
pENTRY (blue)	Kan ^R	KanR-s	AACGTCTCCCTCGAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
		KanR-as	AACGTCTCCATTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG
	Blue-GCAC	Blue-GCAC-s	AACGTCTCCGTGCAAGAGAGCCTGCAGCCCAATACGC
		Blue-GCAC-as	AACGTCTCCCTGCCAGAGAGCCTCGAGGTGAACC
pFF.c (blue)	ColE1 ori	ColE1-s	AACGTCTCACGAGAGGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGAC
		ColE1-as	AACGTCTCAGCAGTCTGTCACTGAAGCTTGCAGTAATACGGTTATCC ACAG
	Amp ^R	AmpR-s	AACGTCTCCCTCGAGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG
		AmpR-as	AACGTCTCCATTCTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
pRSFDuet-1	RSF ori	RSFori-s	AACGTCTCCGAGAGCATGCAGCACTTTCGCTTCTCTCGCTCACTG
		lacI-as	AACGTCTCAGCAGTCTGTCACTGAAGCTTGCACGCAATTAATGT AAGTTAG

Primer für Konstruktion der pFXT7-Vektoren

pPSG(wt) / pPSG(3'- StrepII) / pPSG(5'- StrepII)	T7 cassette	T7cas_pFn1 s	AAAGTCTTCAATGAATGCAGGATCTCGATCCCGC
		T7cas_pFn1 as	AAAGTCTTCCATTCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCG
	T7 cassette	T7cas_pFc1 s	AAAGTCTTCAATAATGCAGGATCTCGATCCCGC
		T7cas_pFc1 as	AAAGTCTTCTCCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCG

Sonstige Oligonukleotide für die Konstruktion der kompatiblen Expressionsplasmide

Lg ^{ul} (out).2	Lg ^{ul} (out).2 s	GCAAGCTCTTACGAATGAGAGCGTACGTCTCAGGGAGGCAGAAGAGC
	Lg ^{ul} (out).2 as	GCCGCTCTTCTGCCTCCCTGAGACGTACGTCTCTCATTGCTGAAGAGC
Lg ^{ul} (out).3a	Lg ^{ul} (out).3a s	GCCGCTCTTACGAATGAGAGAGCGTACGTCTCAGGGAGGCAGAAGAGC
	Lg ^{ul} (out).3a as	GCAAGCTCTTCTGCCTCCCTGAGACGTACGTCTCTCATTGCTGAAGAGC

Farbcode: Grün = *Esp3I* Erkennungsstelle; Rot = *Lg^{ul}* Erkennungsstelle; Blau = spezifische 3-Basen-Überhänge nach *Lg^{ul}*-Verdau (siehe auch Abb. III.3).

Tabelle VI.2 – Liste der hergestellten Plasmide und Konstrukte für SH-Produktions- und Reifungsstudien. Für die Expressionskonstrukte sind die jeweils relevanten Stämme angegeben. Originalplasmide sind in Tabelle II.2 gelistet. Konstrukte, welche für die Produktion von einzelnen Hyp- oder Hox-Proteinen bzw. zur Koexpression im Rahmen der Komplex-Produktion und –Reinigung eingesetzt wurden, sind in Tabelle III.12 angegeben. Tabelle III.14 liefert eine Übersicht zu den Plasmiden, welche zur Herstellung der ZFM-Extrakte benötigt wurden.

Bezeichnung	Gene, Vektor-Charakteristika und relevante Stämme
Neu synthetisierte Vektoren	
pFnT7(wt)	Monicistronischer US Fusionsvektor; pseudo-wt; Amp ^R ; lacP/Z
pFnT7(3')	Monicistronischer US Fusionsvektor; 3'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z
pFnT7(5')	Monicistronischer US Fusionsvektor; 5'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z
pFcT7(wt)	Monicistronischer DS Fusionsvektor; pseudo-wt; Amp ^R ; lacP/Z
pFcT7(3')	Monicistronischer DS Fusionsvektor; 3'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z
pFcT7(5')	Monicistronischer DS Fusionsvektor; 5'-StrepII-tag; Amp ^R ; lacP/Z
pA / pAmp.RSF.3a(blue)	pEntry (ColE1/Kan ^R)-kompatibler <i>Esp3I</i> -in Vektor; Amp ^R ; RSF ori; lacP/Z
pS / pSm.CDF.3a(blue)	pEntry (ColE1/Kan ^R)-kompatibler <i>Esp3I</i> -in Vektor; Sm ^R ; CDF ori; lacP/Z
Expressionsplasmide für SH-Produktionsstämme (Stämme: Tabelle III.6)	
pSH4.wt	<i>hoxY, hoxH, hoxU, hoxF</i> ; Kan ^R ; ColE1 ori (Stämme: K1A, K1A-HoxN1, Alle Deletions- und Substitutions-Stämme)
pSH6.wt	<i>hoxY, hoxH, hoxU, hoxF, hoxI</i> ; Kan ^R ; ColE1 ori (Stämme: K1-hex, K1-hex-HoxN1 ← nicht in Tabelle III.6 enthalten)
pSH4.Strep	<i>hoxY, hoxH, hoxU, 5'-StrepII-hoxF</i> ; Kan ^R ; ColE1 ori (Stämme: SH1F, SH1F-HoxN1)
pSH6.Strep	<i>hoxY, hoxH, 5'-StrepII-hoxI, hoxU, hoxF</i> ; Kan ^R ; ColE1 ori (Stämme: SH2F; SH2F-HoxN1)
pE.M1	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Kan ^R ; ColE1 ori (Stamm: NAES4.1)
pM1	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stämme: K1A, SH1F, SH2F, K1-hex ← nicht in Tabelle III.6 enthalten)
pM1- <i>hoxN1</i>	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2, hoxN1</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stämme: K1A-HoxN1, SH1F-HoxN1, SH2F-HoxN1, K1-hex-HoxN1 ← nicht in Tabelle III.6 enthalten)
pM2	<i>hypX, hoxW, hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypA3, hypB3</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B)
pM2- <i>hoxN1</i>	<i>hypX, hoxW, hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypA3, hypB3, hoxN1</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B-HoxN1)
pM1- <i>hoxF</i> .Strep	<i>5'-StrepII-hoxF, hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: SHdec1)
pM1- <i>hoxUF</i> .Strep	<i>hoxU, 5'-StrepII-hoxF, hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: SHdec3)
pA-SH4.Strep	<i>hoxY, hoxH, hoxU, 5'-StrepII-hoxF</i> ; Amp ^R ; RSF ori (Stämme: NAES4.1, NAES6.1)
pE- <i>hypF2E1XhoxW</i>	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW</i> ; Kan ^R ; ColE1 ori (Stamm: NAES6.1)
pS- <i>hypC1D1A2B2</i>	<i>hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: NAES6.1)
pASGwt- <i>hoxYH</i>	<i>hoxY, hoxH</i> (bicistronisch; Tet-reguliert); Amp ^R ; ColE1 ori (Stamm: SHdec3)
pASGwt- <i>hoxUYH</i>	<i>hoxY, hoxH, hoxU</i> (tricistronisch; Tet-reguliert); Amp ^R ; ColE1 ori (Stamm: SHdec1)

Expressionsplasmide für *in-vivo*-Reifungsexperimente (Stämme: Tabelle III.13)

pM1 ΔhypA2B2	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A Δ HypA2B2)
pM1 ΔhypC1D1	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A Δ HypC1D1)
pM1 ΔhypE1F2	<i>hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A Δ HypE1F2)
pM1 ΔhoxW	<i>hypX, hypF2, hypE1, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A Δ HoxW)
pM1 ΔhypX	<i>hoxW, hypF2, hypE1, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A Δ HypX)
pM2 ΔhypA3B3	<i>hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypX, hoxW</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B Δ HypA3B3)
pM2 ΔhypC2D2	<i>hypE2, hypF3, hypA3, hypB3, hypX, hoxW</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B Δ HypC2D2)
pM2 ΔhypE2F3	<i>hypC2, hypD2, hypA3, hypB3, hypX, hoxW</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B Δ HypE2F3)
pM2 ΔhoxW	<i>hypX, hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypA3, hypB3</i> ; Sm ^R ; CDF (Stamm: K1B Δ HoxW)
pM2 ΔhypX	<i>hoxW, hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypA3, hypB3</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B Δ HypX)
pM1-hypA3B3 ΔhypA2B2	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA3, hypB3</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A-HypA3B3 Δ HypA2B2)
pM1-hypC2D2 ΔhypC1D1	<i>hypF2, hypE1, hypX, hoxW, hypA2, hypB2, hypC2, hypD2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A-HypC2D2 Δ HypC1D1)
pM1-hypE2F3 ΔhypE1F2	<i>hypE2, hypF3, hypX, hoxW, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A-HypE2F3 Δ HypE1F2)
pM1-PHG070 ΔhoxW	<i>hypX, PHG070, hypF2, hypE1, hypC1, hypD1, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1A-PHG070 Δ HoxW)
pM2-hypA2B2 ΔhypA3B3	<i>hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypX, hoxW, hypA2, hypB2</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B-HypA2B2 Δ HypA3B3)
pM2-hypC1D1 ΔhypC2D2	<i>hypE2, hypF3, hypA3, hypB3, hypX, hoxW, hypC1, hypD1</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B-HypC1D1 Δ HypC2D2)
pM2-hypE1F2 ΔhypE2F3	<i>hypF2, hypE1, hypC2, hypD2, hypA3, hypB3, hypX, hoxW</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B-HypE1F2 Δ HypE2F3)
pM2-PHG070 ΔhoxW	<i>hypX, PHG070, hypE2, hypF3, hypC2, hypD2, hypA3, hypB3</i> ; Sm ^R ; CDF ori (Stamm: K1B-PHG070 Δ HoxW)

Tabelle VI.3 – Untersuchung von Redox-Bedingungen und dem Einfluss von O₂ während der SH-Reinigung. Es wurde je 1 Gramm Zellen, die vorher ausgehend von derselben Zellpaste (Stamm SH1F; SHVar1; Expressionsbedingungen gemäß „Standard-Autoinduktion“; Abschnitt III.2.2) aliquotiert wurden, für jeden analogen Versuch eingesetzt. Zellaufschluss erfolgte mittels Gefrieren/Auftauen (II.4.1; 50 mM KPi-Puffer pH 7,0 + DNase, 0.05 mM PMSF, 25 µg Avidin). Der Puffer und die anschließende Aufschluss-Suspension wurden gemäß den unten angegebenen „Reinigungsbedingungen“ behandelt. Die 2-Schritt-Reinigung erfolgte analog II.4.3.2, jedoch mit einer 1 mL StrepTactin Sepharose® Gravity Flow Säule. Angegebene Aktivitäten wurden anaerob gemäß II.4.5.1 gemessen. Die ZFE-Aktivität wurde unmittelbar vor Beladen der Säule gemessen. Die finale Aktivität wurde in der gepoolten und konzentrierten Gelfiltrations-Fraktion gemessen.

Reinigungs- bedingungen	ZFE spezifische Aktivität [U·mg⁻¹]	Finale spezifische Aktivität [U·mg⁻¹]	Reinigungs- faktor	Aus- beute
Aufschlusspuffer Luftgesättigt	0,6	36	61	16%
Aufschlusspuffer O ₂ - gesättigt	0,6	52	88	16%
Aufschlusspuffer + 50 mM Succinat unter Argon	0,7	126	181	19%

Tabelle VI.4 – Katalytische Eigenschaften verschiedener SH-Proben bzw. –Präparationen.

Probe ^a	Enzymgehalt	Aktivierung	Assay ^b	"lag" Phase [sek] ^c	v _{max} [U·mg ⁻¹]
Wildtyp-SH aus <i>Cupriavidus necator</i> (frühe Präparation)					
Frühe Präp. (+)	46 nM	5 µM NADH		n. b.	69,3
		40 µM NADPH	Anaerob	n. b.	68
		nein		145	62,9
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	56,4
Rekombinante tetramere SH Variante 1 aus <i>E. coli</i> SH1F					
Präp. 1 (+)	49 nM	5 µM NADH		n. b.	51,5
		40 µM NADPH	Anaerob	185	49,2
		nein		195	48,7
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	40,9
Präp. 2 (++)	35 nM	5 µM NADH		n. b.	84,2
		40 µM NADPH	Anaerob	95	80,8
		nein		95	80
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	62,1
		nein		190	60,3
Rekombinante hexamere SH Variante 2 aus <i>E. coli</i> SH2F					
Präp. 1 (+)	55 nM	5 µM NADH		n. b.	43,5
		40 µM NADPH	Anaerob	n. b.	43,8
		nein		185	41,9
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	36,5
Präp. 2 (++)	37 nM	5 µM NADH		n. b.	79,5
		40 µM NADPH	Anaerob	n. b.	79,2
		nein		90	79,2
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	62,2
		nein		175	59,9
ZFE	20 µL des verdünnten ZFE (1:50 v:v)	5 µM NADH		n. b.	0,99
		40 µM NADPH	Anaerob	n. b.	1,05
		nein		n. b.	0,99
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	0,88
		nein		20	0,82
Rekombinante tetramere Wildtyp-SH aus <i>E. coli</i> K1A ΔHypX (nur ZFE)					
ZFE	20 µL des verdünnten ZFE (1:50 v:v)	5 µM NADH		n. b.	0,83
		40 µM NADPH	Anaerob	n. b.	0,83
		nein		n. b.	0,79
		5 µM NADH	Aerob	n. b.	0,75
		nein		65	0,16 ^d

^a Präparationen 1 bzw. 2 stellen Fraktionen unterschiedlicher Qualität (+ bzw. ++) dar; ZFE = Zellfreier Extrakt.

^b Anaerobe bzw. aerobe Assays (II.4.5.1) enthielten stets finale H₂-Konzentrationen von 30 µM.

^c Der Begriff „lag“ Phase, Bestimmungsmethoden und zugrunde liegende Literatur findet sich in Abschnitt IV.5.

^d Extrakte aus ΔHypX-Stämmen ergaben in Abwesenheit eines Aktivators nach deutlicher „lag“-Phase unter aeroben Bedingungen eine nur etwa 20%ige (Vgl. mit aktivierter Form) Aktivität (vgl. [202]).

VI.1 Klonierte *Cn*-Gene: Sequenzdaten und pE-Klone

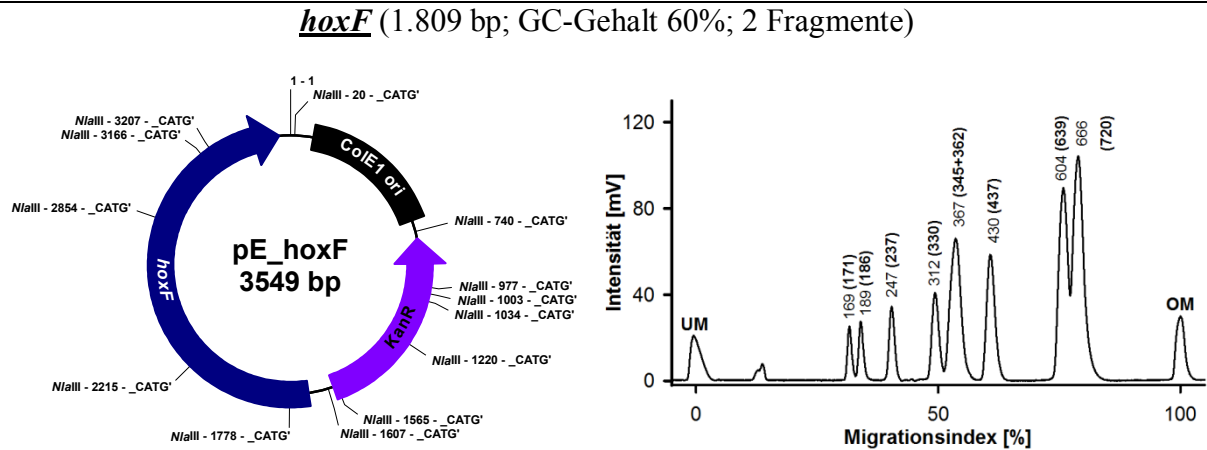


Abb. VI.1 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdau von pE-*hoxF*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hoxF	ATGGATAGTCGTATCAGGACAATACTCGAGCGCTACCGCTCAGACCGTACACGGCTGATC	60
hoxF_merge	ATGGATAGTCGTATCAGGACAATACTCGAGCGCTACCGCTCAGACCGTACACGGCTGATC	60
hoxF	GACATACTTTGGGATGTTTCAGCATGAGTATGGGCACATTCCCGATGCGGTACTGCCGCAA	120
hoxF_merge	GACATACTTTGGGATGTTTCAGCATGAGTATGGGCACATTCCCGATGCGGTACTGCCGCAA	120
hoxF	CTGGGGGCTGGGTGAAGCTGTCCCGCTGGACATTCCGGAACGGCGTCTGTTCTACCAC	180
hoxF_merge	CTGGGGGCTGGGTGAAGCTGTCCCGCTGGACATTCCGGAACGGCGTCTGTTCTACCAC	180
hoxF	TTTTTCCTTGACAAGCCGTCGGGCAAGTATCGGATTTACTTGTGCAATTCCGTGATTGCC	240
hoxF_merge	TTTTTCCTTGACAAGCCGTCGGGCAAGTATCGGATTTACTTGTGCAATTCCGTGATTGCC	240
hoxF	AAGATCAACGGCTATCAGGCGGTGCGTGAGGCGCTCGAACGCGAGACTGGGATTTCGCTTC	300
hoxF_merge	AAGATCAACGGCTATCAGGCGGTGCGTGAGGCGCTCGAACGCGAGACTGGGATTTCGCTTC	300
hoxF	GGCGAAACCGACCCGAATGGGATGTTGGCCTGTTTCGACACCCCTGTATCGGACTCAGC	360
hoxF_merge	GGCGAAACCGACCCGAATGGGATGTTGGCCTGTTTCGACACCCCTGTATCGGACTCAGC	360
hoxF	GATCAGGAACCGGCGATGCTGATCGATAAGTGGTATTACCCCGCTGCGACCCGGAAG	420
hoxF_merge	GATCAGGAACCGGCGATGCTGATCGATAAGTGGTATTACCCCGCTGCGACCCGGAAG	420
hoxF	ATCAGGACATCATCGCGCAGTTGAAACAAGGACGATCGCCGGCCGAGATCGCGAACCCG	480
hoxF_merge	ATCAGGACATCATCGCGCAGTTGAAACAAGGACGATCGCCGGCCGAGATCGCGAACCCG	480
hoxF	GCCGGTTTGCCCAAGTCAGGACATCGCCTATGTCGATGCCATGGTCGAGTCCAATGTCCGC	540
hoxF_merge	GCCGGTTTGCCCAAGTCAGGACATCGCCTATGTCGATGCCATGGTCGAGTCCAATGTCCGC	540
hoxF	ACCAAGGGGCGGTGTTCTTCCTGCGGCGGACGGATTGAGATCTTTGCTCGACCAATGC	600
hoxF_merge	ACCAAGGGGCGGTGTTCTTCCTGCGGCGGACGGATTGAGATCTTTGCTCGACCAATGC	600
hoxF	CTGCTGCTCAAGCCGAACAAGTATTGAGACCATCGTCGACTCCAGGCTGCGCGGACGT	660
hoxF_merge	CTGCTGCTCAAGCCGAACAAGTATTGAGACCATCGTCGACTCCAGGCTGCGCGGACGT	660
hoxF	GGCGGCGCAGGGTTCTCGACCGGCTGAAGTGGCGGCTGTGTCGGGATGCCGAAAGCGAG	720
hoxF_merge	GGCGGCGCAGGGTTCTCGACCGGCTGAAGTGGCGGCTGTGTCGGGATGCCGAAAGCGAG	720
hoxF	CAGAAGTATGTAATCTGCAACGCCGACGAAGGTGAGCCCGGCACGTTCAAGGATAGGGTC	780
hoxF_merge	CAGAAGTATGTAATCTGCAACGCCGACGAAGGTGAGCCCGGCACGTTCAAGGATAGGGTC	780
hoxF	CTCCTGACACGCGCTCCCAAGAAGGTTTTCGTCGGAATGGTTATCGCCGCGTATGCCATC	840
hoxF_merge	CTCCTGACACGCGCTCCCAAGAAGGTTTTCGTCGGAATGGTTATCGCCGCGTATGCCATC	840
hoxF	GGCTGCCGCAAGGGTATCGTCTATCTGCGGGGGAATACTTCTACCTCAAGGATTATCTG	900
hoxF_merge	GGCTGCCGCAAGGGTATCGTCTATCTGCGGGGGAATACTTCTACCTCAAGGATTATCTG	900
hoxF	GAGCGACAGCTTCAGGAACCTTCGGGAGGACGGGTTGCTGGGCGCGCTATCGGTGGCCGG	960
hoxF_merge	GAGCGACAGCTTCAGGAACCTTCGGGAGGACGGGTTGCTGGGCGCGCTATCGGTGGCCGG	960
hoxF	GCGGGCTTTGATTTCGATATCCGATTCAGATGGGGGCGGCGCTTATATCTGCGGCGAC	1020
hoxF_merge	GCGGGCTTTGATTTCGATATCCGATTCAGATGGGGGCGGCGCTTATATCTGCGGCGAC	1020
hoxF	GAATCGGCGCTCATCGAGTCTTCGAGGGGAAACGGGGCACGCCACGGGTGAAACCTCCG	1080
hoxF_merge	GAATCGGCGCTCATCGAGTCTTCGAGGGGAAACGGGGCACGCCACGGGTGAAACCTCCG	1080
hoxF	TTCCCGGTGCAGCAAGGGTATCTGGGCAAGCCACACGCTCAACAACGTTGAGACCTTT	1140
hoxF_merge	TTCCCGGTGCAGCAAGGGTATCTGGGCAAGCCACACGCTCAACAACGTTGAGACCTTT	1140
hoxF	GCCGCGGTGTCGCGGATCATGGAGGAAGGCGCGGACTGGTTCGGGCGATGGGAACGCCA	1200
hoxF_merge	GCCGCGGTGTCGCGGATCATGGAGGAAGGCGCGGACTGGTTCGGGCGATGGGAACGCCA	1200
hoxF	GACTCGGCCGACCCGCTGCTGAGCGTGGCTGGCGATTGAGCAAGCTGGCATCTAC	1260
hoxF_merge	GACTCGGCCGACCCGCTGCTGAGCGTGGCTGGCGATTGAGCAAGCTGGCATCTAC	1260
hoxF	GAGGTGGAATGGGGGTCACCTCAACGAAGTGTGGCGATGGTCGGAGCGCGGGACGCG	1320
hoxF_merge	GAGGTGGAATGGGGGTCACCTCAACGAAGTGTGGCGATGGTCGGAGCGCGGGACGCG	1320
hoxF	CGGGCCGTCAGATCAGCGGTCTTCCGGTGAATGCGTGTGCGTGGCAAGGACGCGTGAG	1380
hoxF_merge	CGGGCCGTCAGATCAGCGGTCTTCCGGTGAATGCGTGTGCGTGGCAAGGACGCGTGAG	1380
hoxF	CGCAAGCTCGCGTACGAAGATCTTTCGTCGAATGGCGCTTACCATTTCCTCAACTGCAAG	1440
hoxF_merge	CGCAAGCTCGCGTACGAAGATCTTTCGTCGAATGGCGCTTACCATTTCCTCAACTGCAAG	1440
hoxF	CGCGACCTGCTGGAATCGTGCCTGACCATGCAGTCTTTCGTCGAAGAGTCTCGGCG	1500
hoxF_merge	CGCGACCTGCTGGAATCGTGCCTGACCATGCAGTCTTTCGTCGAAGAGTCTCGGCG	1500
hoxF	ATTTGTGTGCCATGTCGCGCCGCAACGTTGATCTGCACCGGAAGGTCGAATGGGTCATC	1560
hoxF_merge	ATTTGTGTGCCATGTCGCGCCGCAACGTTGATCTGCACCGGAAGGTCGAATGGGTCATC	1560
hoxF	GCGGGCAAGGCTGCGCAAGGATCTGGACGATATGGTCAGTTGGGAGCGCTGGTGGCG	1620
hoxF_merge	GCGGGCAAGGCTGCGCAAGGATCTGGACGATATGGTCAGTTGGGAGCGCTGGTGGCG	1620
hoxF	AGGACAGTCGATGTGGCTTGGGGCCACATCGCCCAAGCCATCTGACGACGCTGGAG	1680
hoxF_merge	AGGACAGTCGATGTGGCTTGGGGCCACATCGCCCAAGCCATCTGACGACGCTGGAG	1680
hoxF	AAATTCGCCGAGATCTATCAGAACAGCTGGTGAGGACGAGGGGCGCTGCTGCCATCG	1740

```

hoxF_merge      AAATTCCTCCGAGATCTATCAGAACAAAGCTGGTGAGGCACGAGGCGCTGCTGCCATCG 1740
hoxF            TTCGATCTCGATACCGCCTTGGGCGGGTATGAGAAGGCGCTGAAGGATCTGGAAGAGGTG 1800
hoxF_merge      TTCGATCTCGATACCGCCTTGGGCGGGTATGAGAAGGCGCTGAAGGATCTGGAAGAGGTG 1800
hoxF            ACAAGATGA 1809
hoxF_merge      ACAAGATGA 1809

```

Abb. VI.2 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxF* mit der genom-annotierten Sequenz. *hoxF* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG088; [236]); *hoxF_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hoxF*.1 und pF-*hoxF*.2 Klone. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

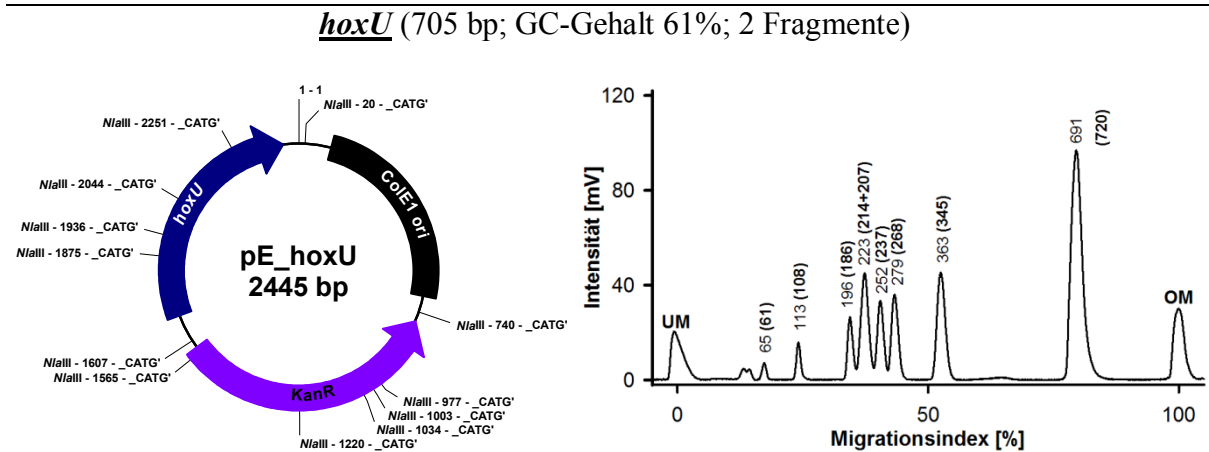


Abb. VI.3 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hoxU*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hoxU            ATGAGCATTCAAATTACGATCGACGGCAAGACGCTCACGACCGAGGAAGGACGAACGCTG 60
hoxU_merge      ATGAGCATTCAAATTACGATCGACGGCAAGACGCTCACGACCGAGGAAGGACGAACGCTG 60
hoxU            GTGGATGTTGCCGCAGAGAACGGCGTTTACATCCCGACGCTGTGCTACCTCAAGGACAAG 120
hoxU_merge      GTGGATGTTGCCGCAGAGAACGGCGTTTACATCCCGACGCTGTGCTACCTCAAGGACAAG 120
hoxU            CCTGCTCGGCACCTGCCGGGTGTGTTCCGGTCAAGGTGAATGGCAATGTCGCCGCGGCA 180
hoxU_merge      CCTGCTCGGCACCTGCCGGGTGTGTTCCGGTCAAGGTGAATGGCAATGTCGCCGCGGCA 180
hoxU            TGTACGGTGGCGGTCTCGAAGGGCCTGAATGTCGAGGTCAACGACCCGGAATTGGTCGAC 240
hoxU_merge      TGTACGGTGGCGGTCTCGAAGGGCCTGAATGTCGAGGTCAACGACCCGGAATTGGTCGAC 240
hoxU            ATGCGCAAGGCGCTGGTCAATTCTCTGTTTCGCGGAAGGCAACCACAACCTGCCCGAGTTGC 300
hoxU_merge      ATGCGCAAGGCGCTGGTCAATTCTCTGTTTCGCGGAAGGCAACCACAACCTGCCCGAGTTGC 300
hoxU            GAGAAAGAGCGCGCGCTTGCCAGTTGTCAGGCGGTTCGCTACGAGGTGGACATGATGGTCTCG 360
hoxU_merge      GAGAAAGAGCGCGCGCTTGCCAGTTGTCAGGCGGTTCGCTACGAGGTGGACATGATGGTCTCG 360
hoxU            CGCTTTCGCTACCGGTTCCCGGTCCGCGTGGTGACACGCGTCCGAAAAGATCTGGCTC 420
hoxU_merge      CGCTTTCGCTACCGGTTCCCGGTCCGCGTGGTGACACGCGTCCGAAAAGATCTGGCTC 420
hoxU            GAGCGGGATCGGTGCATCTTCTGTGACGCGTGTGTCGAGTTTCATCCGCGACAAGGCAAGC 480
hoxU_merge      GAGCGGGATCGGTGCATCTTCTGTGACGCGTGTGTCGAGTTTCATCCGCGACAAGGCAAGC 480
hoxU            GGCCGGAAGATCTTCAGCATCAGCCATCGGGGTCCCGAGTCGCGCATCGAGATCGATGCC 540
hoxU_merge      GGCCGGAAGATCTTCAGCATCAGCCATCGGGGTCCCGAGTCGCGCATCGAGATCGATGCC 540
hoxU            GCGCGGAAGATCTTCAGCATCAGCCATCGGGGTCCCGAGTCGCGCATCGAGATCGATGCC 540
hoxU_merge      GCGCGGAAGATCTTCAGCATCAGCCATCGGGGTCCCGAGTCGCGCATCGAGATCGATGCC 540
hoxU            GAACTGGCGAAGCCATGCCCGGAGCAAGTCAAAGAGGCGGTTGCGATCTGCCCGGTG 600
hoxU_merge      GAACTGGCGAAGCCATGCCCGGAGCAAGTCAAAGAGGCGGTTGCGATCTGCCCGGTG 600
hoxU            GGCACCATCTTCGAGAAACGGGTGCGTTATGACGATCCCATCGGACGACGCAAGTACGAA 660
hoxU_merge      GGCACCATCTTCGAGAAACGGGTGCGTTATGACGATCCCATCGGACGACGCAAGTACGAA 660
hoxU            ATCCAGTCGGTGCGCGCACGCGCGCTGGAAGGAGAAGACAAATGA 705
hoxU_merge      ATCCAGTCGGTGCGCGCACGCGCGCTGGAAGGAGAAGACAAATGA 705

```

Abb. VI.4 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxU* mit der genom-annotierten Sequenz. *hoxU* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG089; [236]); *hoxU_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hoxU*.1 und pF-*hoxU*.2 Klone. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen Basenaustausch zur Eliminierung der *LguI*-Schnittstelle (siehe Tabelle III.1).

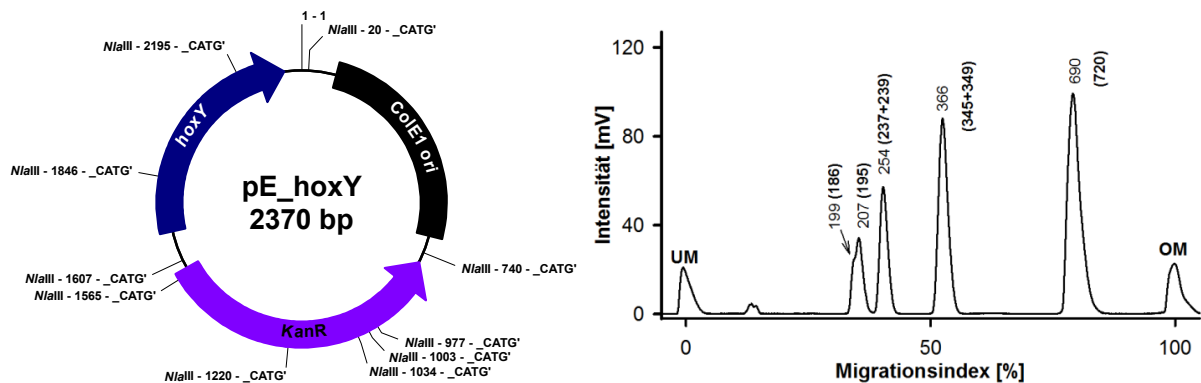
hoxY (630 bp; GC-Gehalt 59%; 2 Fragmente)

Abb. VI.5 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdau von pE-*hoxY*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

<i>hoxY</i>	ATGAGAGCCCCACAAAGACGAGATTGCGTCGCACGAATTGCCTGCGACGCCGATGGAT	60
<i>hoxY_merge</i>	ATGAGAGCCCCACAAAGACGAGATTGCGTCGCACGAATTGCCTGCGACGCCGATGGAT	60
<i>hoxY</i>	CCGGCGCTGGCCGCGAACCGTGAAGGCAAGATCAAGGTGGCCACGATCGGTCTGTGCGGC	120
<i>hoxY_merge</i>	CCGGCGCTGGCCGCGAACCGTGAAGGCAAGATCAAGGTGGCCACGATCGGTCTGTGCGGC	120
<i>hoxY</i>	TGCTGGGGGTGTACCTTGTCTTCTCGACATGGACGAGCGGCTCCTGCCGCTGTTGGAG	180
<i>hoxY_merge</i>	TGCTGGGGGTGTACCTTGTCTTCTCGACATGGACGAGCGGCTCCTGCCGCTGTTGGAG	180
<i>hoxY</i>	AAAGTCACCCCTCCTCCGCTCGTCGCTGACCGATATCAAACGAATTCGGAGCGCTGTGCG	240
<i>hoxY_merge</i>	AAAGTCACCCCTCCTCCGCTCGTCGCTGACCGATATCAAACGAATTCGGAGCGCTGTGCG	240
<i>hoxY</i>	ATCGGCTTCGTGGAAGGTGGGCTCTCGAGCGAGGAGAACATCGAAACGCTGGAGCACTTT	300
<i>hoxY_merge</i>	ATCGGCTTCGTGGAAGGTGGGCTCTCGAGCGAGGAGAACATCGAAACGCTGGAGCACTTT	300
<i>hoxY</i>	CGCGAGAACTGCGACATCCTGATTTCGGTCGGGGCGTGC GCGGTGTGGGGCGGTGTGCCG	360
<i>hoxY_merge</i>	CGCGAGAACTGCGACATCCTGATTTCGGTCGGGGCGTGC GCGGTGTGGGGCGGTGTGCCG	360
<i>hoxY</i>	GCGATGCGCAACGTCTTCGAGCTGAAAGATTGTCTGGCAGAGGCTTATGTCAACTCGGCG	420
<i>hoxY_merge</i>	GCGATGCGCAACGTCTTCGAGCTGAAAGATTGTCTGGCAGAGGCTTATGTCAACTCGGCG	420
<i>hoxY</i>	ACTGCCGTCCTCCGGGCGCAAGGCCGTCGTTCCATTCCATCCCGATATCCCGAGGATCACC	480
<i>hoxY_merge</i>	ACTGCCGTCCTCCGGGCGCAAGGCCGTCGTTCCATTCCATCCCGATATCCCGAGGATCACC	480
<i>hoxY</i>	ACCAAGGTCTACCTTGTTCATGAGGTGGTCAAGATGGATTATTTCATTCGGGGTGTGCC	540
<i>hoxY_merge</i>	ACCAAGGTCTACCTTGTTCATGAGGTGGTCAAGATGGATTATTTCATTCGGGGTGTGCC	540
<i>hoxY</i>	CCGGATGGAGATGCCATCTTCAAGTGTCTGGACGATCTGGTGAATGGACGCCATTTCGAT	600
<i>hoxY_merge</i>	CCGGATGGAGATGCCATCTTCAAGTGTCTGGACGATCTGGTGAATGGACGCCATTTCGAT	600
<i>hoxY</i>	TTGCCGAGCTCGATCAATCGCTACGATTGA	630
<i>hoxY_merge</i>	TTGCCGAGCTCGATCAATCGCTACGATTGA	630

Abb. VI.6 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxY* mit der genom-annotierten Sequenz. *hoxY* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG090; [236]); *hoxY_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hoxY*.1 und pF-*hoxY*.2 Klon. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen Basenaustausch zur Eliminierung der *Esp31*-Schnittstelle (siehe Tabelle III.1).

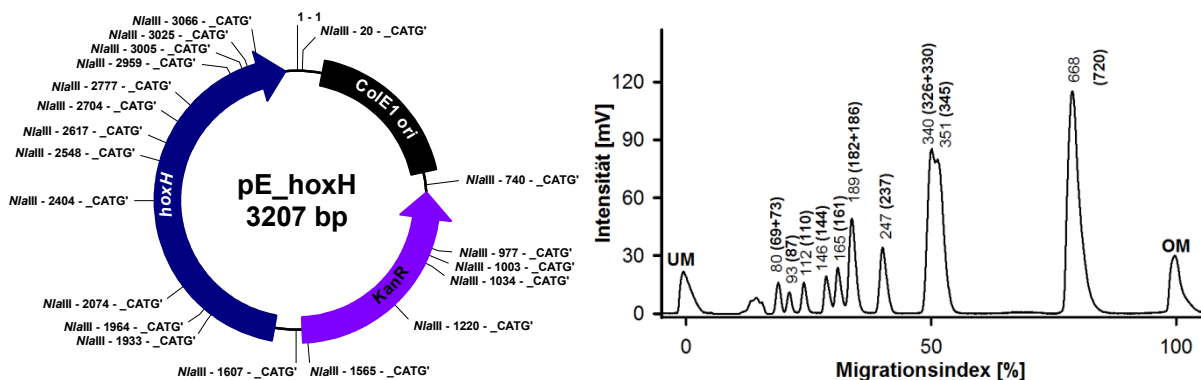
hoxH (1.467 bp; GC-Gehalt 61%)

Abb. VI.7 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hoxH*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hoxH	ATGAGCAGAAAACTGGTTATCGACCCGGTGACCCGCATCGAGGGTCACGGCAAGGTGGT	60
hoxH_seq	ATGAGCAGAAAACTGGTTATCGACCCGGTGACCCGCATCGAGGGTCACGGCAAGGTGGT	60
hoxH	GTGCACCTGGATGACGACAACAAGTCGTCGACGCAAGCTGCACGTCGTGGAGTCCCG	120
hoxH_seq	GTGCACCTGGATGACGACAACAAGTCGTCGACGCAAGCTGCACGTCGTGGAGTCCCG	120
hoxH	GGCTTTGAAAAGTTCGTTTCAGGGCCATCCCTTCTGGGAGGCGCCGATGTTCTCGACGCG	180
hoxH_seq	GGCTTTGAAAAGTTCGTTTCAGGGCCATCCCTTCTGGGAGGCGCCGATGTTCTCGACGCG	180
hoxH	ATCTGCGGCATCTGTTTCGTCAGTCACCATCTGTGCGGGGCCAAGGCGCTGGATGACATG	240
hoxH_seq	ATCTGCGGCATCTGTTTCGTCAGTCACCATCTGTGCGGGGCCAAGGCGCTGGATGACATG	240
hoxH	GTCGGCGTCGGCTTGAAGTCCGGCATCCATGTACCCCGACGGCGGAGAAAATGCGCCGG	300
hoxH_seq	GTCGGCGTCGGCTTGAAGTCCGGCATCCATGTACCCCGACGGCGGAGAAAATGCGCCGG	300
hoxH	CTCGGCCACTACGCGCAGATGCTCCAGTCCCATACGACCGCCTATTCTACCTGATCGTG	360
hoxH_seq	CTCGGCCACTACGCGCAGATGCTCCAGTCCCATACGACCGCCTATTCTACCTGATCGTG	360
hoxH	CCGGAGATGCTGTTTGGCATGGACGCGCCGCCCGCACAGCGCAACGTGCTCGGCCTGATC	420
hoxH_seq	CCGGAGATGCTGTTTGGCATGGACGCGCCGCCCGCACAGCGCAACGTGCTCGGCCTGATC	420
hoxH	GAGGCCAATCCCGACTTGGTGAAGCGCGTCGTGATGTTGCGCAAAATGGGGACAGGAATC	480
hoxH_seq	GAGGCCAATCCCGACTTGGTGAAGCGCGTCGTGATGTTGCGCAAAATGGGGACAGGAATC	480
hoxH	ATCAAGCGGTGTTTCGGCAAGAAGATGCACGGCATCAATTCGGTGCCGGGAGGCGTCAAC	540
hoxH_seq	ATCAAGCGGTGTTTCGGCAAGAAGATGCACGGCATCAATTCGGTGCCGGGAGGCGTCAAC	540
hoxH	AACAACCTGAGCATCGCCGAGCGCGACCGTTTCTGAAACGGGGAGGAGGGCCTTCTGTGCG	600
hoxH_seq	AACAACCTGAGCATCGCCGAGCGCGACCGTTTCTGAAACGGGGAGGAGGGCCTTCTGTGCG	600
hoxH	GTGGATCAGGTATCGATTACGCGCAGGATGGCCTGCGCCTGTTCTACGACTTCCATCAG	660
hoxH_seq	GTGGATCAGGTATCGATTACGCGCAGGATGGCCTGCGCCTGTTCTACGACTTCCATCAG	660
hoxH	AAACACCGGGCGCAGGTGATAGTTTCGCGGACGTGCCGCGCTCAGCATGTGCTTGGTC	720
hoxH_seq	AAACACCGGGCGCAGGTGATAGTTTCGCGGACGTGCCGCGCTCAGCATGTGCTTGGTC	720
hoxH	GGCGACGACGACAACGTGGACTACTACCACGGCAGGCTGAGGATCATCGACGACGACAAG	780
hoxH_seq	GGCGACGACGACAACGTGGACTACTACCACGGCAGGCTGAGGATCATCGACGACGACAAG	780
hoxH	CACATCGTCCGTGAATTCGACTATCAGGACTATCTGGATCATTCTCCGAAGCGGTGGAG	840
hoxH_seq	CACATCGTCCGTGAATTCGACTATCAGGACTATCTGGATCATTCTCCGAAGCGGTGGAG	840
hoxH	GAATGGAGCTACATGAAGTTCCTTACCTCAAGGAGCTTGGGAGAGAGCAGGGATCGGTG	900
hoxH_seq	GAATGGAGCTACATGAAGTTCCTTACCTCAAGGAGCTTGGGAGAGAGCAGGGATCGGTG	900
hoxH	CGCGTGGGGCCGCTTGGCCGCATGAACGTGACGAAGTCGCTCCCGACACCGCTCGCGCAG	960
hoxH_seq	CGCGTGGGGCCGCTTGGCCGCATGAACGTGACGAAGTCGCTCCCGACACCGCTCGCGCAG	960
hoxH	GAGGCGCTGGAACGGTTCCACGCCATACACGAAGGGCGGACGAACAACATGACGCTGCAT	1020
hoxH_seq	GAGGCGCTGGAACGGTTCCACGCCATACACGAAGGGCGGACGAACAACATGACGCTGCAT	1020
hoxH	ACTAAGTGGGCACGGGCCATCGAGATCCTCCACGCCGCGGAGGTGGTCAAAGAACTGCTG	1080
hoxH_seq	ACTAAGTGGGCACGGGCCATCGAGATCCTCCACGCCGCGGAGGTGGTCAAAGAACTGCTG	1080
hoxH	CATGACCCGACCTGCAGAAGGATCAGCTGGTGTGACACCGCCCCCAATGCGTGGACA	1140
hoxH_seq	CATGACCCGACCTGCAGAAGGATCAGCTGGTGTGACACCGCCCCCAATGCGTGGACA	1140
hoxH	GGTGAAGCGCTCGGCGTGGTCGAAGCGCCACGCGGTACCTTGCTTCACCATATCTGTGCC	1200
hoxH_seq	GGTGAAGCGCTCGGCGTGGTCGAAGCGCCACGCGGTACCTTGCTTCACCATATCTGTGCC	1200
hoxH	GATGAGCGCGCAATATCACGTTCCGCCAACCCTGGTCGTGCGCCACCACCGAGAACAACAG	1260
hoxH_seq	GATGAGCGCGCAATATCACGTTCCGCCAACCCTGGTCGTGCGCCACCACCGAGAACAACAG	1260
hoxH	GTCATGAATCGCACGGTGGCGAGCGTCGCGGAGGACTACCTGGGCGGACATGGCGAAATC	1320
hoxH_seq	GTCATGAATCGCACGGTGGCGAGCGTCGCGGAGGACTACCTGGGCGGACATGGCGAAATC	1320
hoxH	ACCGAGGGCATGATGAATGCCATCGAGTGGGTATTTCGCGCCTACGATCCATGCGCTGAGC	1380
hoxH_seq	ACCGAGGGCATGATGAATGCCATCGAGTGGGTATTTCGCGCCTACGATCCATGCGCTGAGC	1380
hoxH	TGCGCGACACACGCCCTGGGGCAGATGCCGCTGGTGGTCTCGGTCTTTGACGCGCGGGG	1440
hoxH_seq	TGCGCGACACACGCCCTGGGGCAGATGCCGCTGGTGGTCTCGGTCTTTGACGCGCGGGG	1440
hoxH	CGCCTGATCGATGAACGCGCCCGTGA	1467
hoxH_seq	CGCCTGATCGATGAACGCGCCCGTGA	1467

Abb. VI.8 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxH* mit der genom-annotierten Sequenz. *hoxH* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG091; [236]); *hoxH_seq* = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hoxH* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

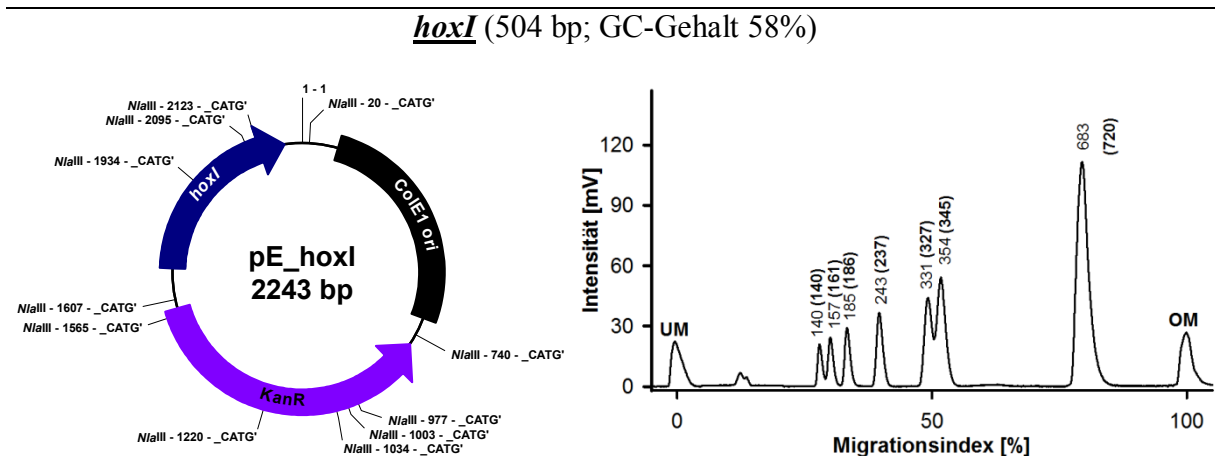


Abb. VI.9 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hoxI*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

<i>hoxI</i>	ATGAAAGAGCAGGAAATCGACAGGATCGCAACGATGATCTACGAGGCGCCTTTGGGCGAG	60
<i>hoxI_seq</i>	ATGAAAGAGCAGGAAATCGACAGGATCGCAACGATGATCTACGAGGCGCCTTTGGGCGAG	60
<i>hoxI</i>	TATATCGGCCGGGATGGCGCTGCCATTCTTGCCGAACACGCCGCGGAAGCACGCCTCCTC	120
<i>hoxI_seq</i>	TATATCGGCCGGGATGGCGCTGCCATTCTTGCCGAACACGCCGCGGAAGCACGCCTCCTC	120
<i>hoxI</i>	AAGGGCGATGAGTTTCTCTACCGGAGAGGAGATGTCAAGCAGCTTTTATATCGTGACC	180
<i>hoxI_seq</i>	AAGGGCGATGAGTTTCTCTACCGGAGAGGAGATGTCAAGCAGCTTTTATATCGTGACC	180
<i>hoxI</i>	GATGGGCGTTTGGCGCTGGTCAGGGAAAAACCAATGAGCGCACCGCGCCCATCGTGCAT	240
<i>hoxI_seq</i>	GATGGGCGTTTGGCGCTGGTCAGGGAAAAACCAATGAGCGCACCGCGCCCATCGTGCAT	240
<i>hoxI</i>	GTGCTGGAAGGGGGACCTGGTTGGCGAGCTGGGTTTATCGATCAGACGCCGATTC	300
<i>hoxI_seq</i>	GTGCTGGAAGGGGGACCTGGTTGGCGAGCTGGGTTTATCGATCAGACGCCGATTC	300
<i>hoxI</i>	TTATCGGTTCTGCTCTGGGCGACGCCGCGTCTCAGCTTCAGCGCGGAAGCATCAA	360
<i>hoxI_seq</i>	TTATCGGTTCTGCTCTGGGCGACGCCGCGTCTCAGCTTCAGCGCGGAAGCATCAA	360
<i>hoxI</i>	CCGCTGATCACCAGCATCCGGAATCATTTCAACTTCATGCGCGCGGTGATCAAGCGC	420
<i>hoxI_seq</i>	CCGCTGATCACCAGCATCCGGAATCATTTCAACTTCATGCGCGCGGTGATCAAGCGC	420
<i>hoxI</i>	GTTACCATGTCGTGGTACTGTCGGGGAGCAGAGAGGAGTTGCAAGAGTACATCTCG	480
<i>hoxI_seq</i>	GTTACCATGTCGTGGTACTGTCGGGGAGCAGAGAGGAGTTGCAAGAGTACATCTCG	480
<i>hoxI</i>	ACGGGGGGAGGGGACGGGTTAG	504
<i>hoxI_seq</i>	ACGGGGGGAGGGGACGGGTTAG	504

Abb. VI.10 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxI* mit der genom-annotierten Sequenz. *hoxI* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG093; [236]); *hoxI_seq* = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hoxI* Klon. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch die vorgenommenen **Basenaustausche** zur Reduzierung des hohen 3'-GC-Gehalts (siehe Tabelle III.1).

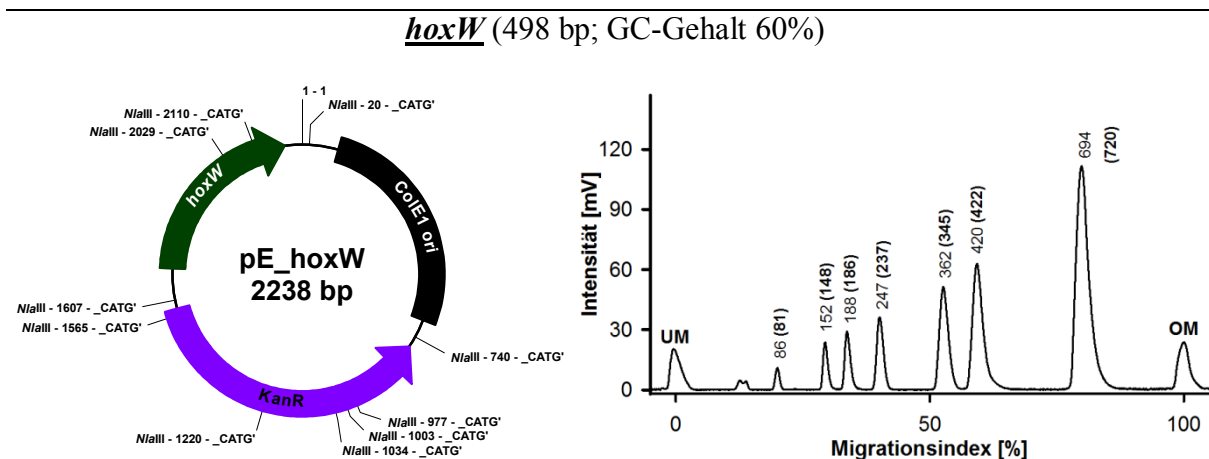


Abb. VI.11 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hoxW*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

<i>hoxW</i>	ATGAACGCGCCCGCTGAGTTTCCCTATGTGACCTTGCCGATTTCGATGATCCGTCGACG	60
<i>hoxW_seq</i>	ATGAACGCGCCCGCTGAGTTTCCCTATGTGACCTTGCCGATTTCGATGATCCGTCGACG	60
<i>hoxW</i>	CTGATCTACGGAATCGGCAACGTGGGTCGGCAGGACGACGGATTGGGGTGGGCTTTATC	120
<i>hoxW_seq</i>	CTGATCTACGGAATCGGCAACGTGGGTCGGCAGGACGACGGATTGGGGTGGGCTTTATC	120
<i>hoxW</i>	GACCGACTGGAAGCGGAGTCCCTCTGCTCCGGGGCGGAGGTTACGCGGCATTATCAGCTT	180
<i>hoxW_seq</i>	GACCGACTGGAAGCGGAGTCCCTCTGCTCCGGGGCGGAGGTTACGCGGCATTATCAGCTT	180
<i>hoxW</i>	CACCTCGAGGATGCCGACCTGATCAGCCGCAAGAGAAAGGTGTTGTTTCATCGATGCCACG	240
<i>hoxW_seq</i>	CACCTCGAGGATGCCGACCTGATCAGCCGCAAGAGAAAGGTGTTGTTTCATCGATGCCACG	240
<i>hoxW</i>	AAAGATGCGTCGGTGGCGTCATTAGCCTGGAGCGCGCGGAACACGGATGGACTTCAGC	300
<i>hoxW_seq</i>	AAAGATGCGTCGGTGGCGTCATTAGCCTGGAGCGCGCGGAACACGGATGGACTTCAGC	300
<i>hoxW</i>	TTTACGTCGACGCGATCTCGATTCCGTCGATCATGGCGACCTGCCAAAGGTGCTTTCAG	360
<i>hoxW_seq</i>	TTTACGTCGACGCGATCTCGATTCCGTCGATCATGGCGACCTGCCAAAGGTGCTTTCAG	360
<i>hoxW</i>	TGCTTGCCGGAAGTCTATGTGCTGGCGATCCGGGGCTACGAGTGGGAGCTCCGCATGGGG	420
<i>hoxW_seq</i>	TGCTTGCCGGAAGTCTATGTGCTGGCGATCCGGGGCTACGAGTGGGAGCTCCGCATGGGG	420
<i>hoxW</i>	CTGACACCGCAGGCACGGCATAACCTGGACGATGCGATCGCCCATTTCTCGATGCGGGCC	480
<i>hoxW_seq</i>	CTGACACCGCAGGCACGGCATAACCTGGACGATGCGATCGCCCATTTCTCGATGCGGGCC	480
<i>hoxW</i>	GAGCGTCAAACCTCGTGA	498
<i>hoxW_seq</i>	GAGCGTCAAACCTCGTGA	498

Abb. VI.12 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxW* mit der genom-annotierten Sequenz. *hoxW* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG092; [236]); *hoxW_seq* = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hoxW* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

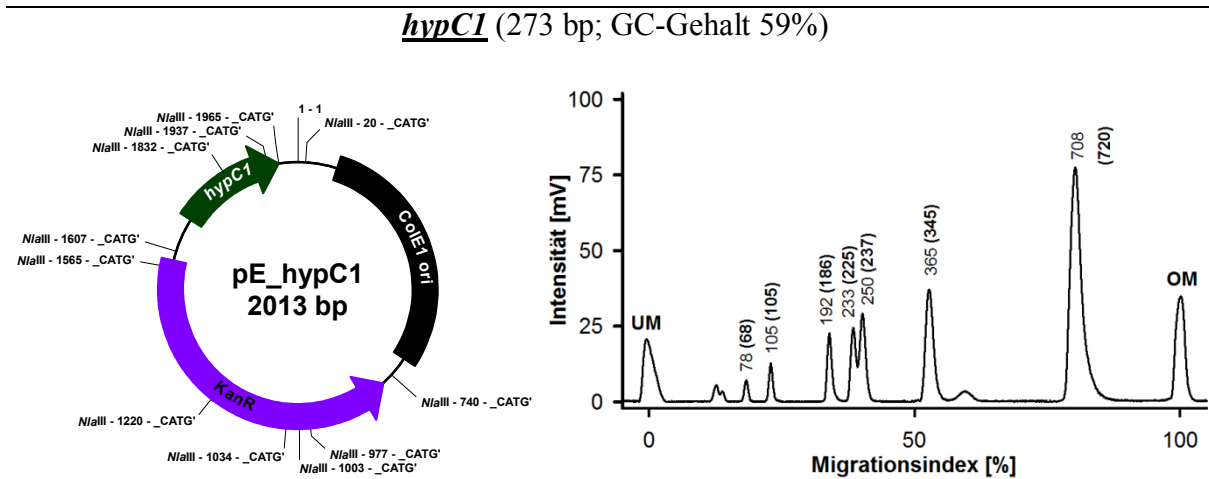


Abb. VI.13 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hypCI*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

<i>hypC1</i>	ATGTGCCTAGCGATTCCCGCACGTTTGGTGGAACTGCAAGCGGACCAGCAGGGCGTAGTC	60
<i>hypC1_seq</i>	ATGTGCCTAGCGATTCCCGCACGTTTGGTGGAACTGCAAGCGGACCAGCAGGGCGTAGTC	60
<i>hypC1</i>	GACCTGAGCGGTGTACGTAAGACCATATCTCTCGCGCTGATGGCCGATGCCGTAGTCGGT	120
<i>hypC1_seq</i>	GACCTGAGCGGTGTACGTAAGACCATATCTCTCGCGCTGATGGCCGATGCCGTAGTCGGT	120
<i>hypC1</i>	GACTACGTCATCGTGCATGTCGGCTACGCGATTGGCAAGATCGATCCAGAGGAAGCAGAA	180
<i>hypC1_seq</i>	GACTACGTCATCGTGCATGTCGGCTACGCGATTGGCAAGATCGATCCAGAGGAAGCAGAA	180
<i>hypC1</i>	CGCACGCTGCGTCTGTTCGCGGAATTGGAGCGAGTGCAGCCGCTGCGTCCGAGCCGATG	240
<i>hypC1_seq</i>	CGCACGCTGCGTCTGTTCGCGGAATTGGAGCGAGTGCAGCCGCTGCGTCCGAGCCGATG	240
<i>hypC1</i>	CATGGGATGAACATTTCATCAGGAGCCGGCATGA	273
<i>hypC1_seq</i>	CATGGGATGAACATTTCATCAGGAGCCGGCATGA	273

Abb. VI.14 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypCI* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypC1* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG015; [236]); *hypC1_seq* = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hypC1* Klon. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch die Anknüpfung eines GGG-Codons (Glycin) anstelle des Stopp-Codons. Dies ermöglicht die 3'-Fusion des ORF mit der StrepII-Tag-Sequenz (C-terminaler StrepII-Tag).

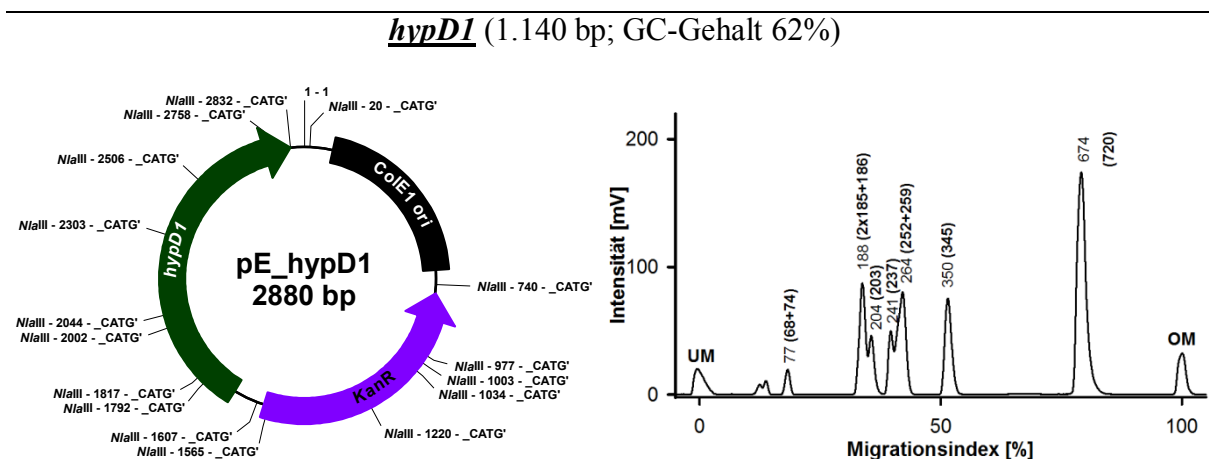


Abb. VI.15 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hypD1*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hypD1	ATGAAATACATCGAAGAATTTTCGCGACGGCGAGCTGGCGCAACGCATTGCGGGCGCACGTT	60
hypD1_seq	ATGAAATACATCGAAGAATTTTCGCGACGGCGAGCTGGCGCAACGCATTGCGGGCGCACGTT	60
hypD1	CGCGCTGAGGCGCGGCGGGGCAACGCTACAACCTCATGGAGTTCTGCGGCGGACACAG	120
hypD1_seq	CGCGCTGAGGCGCGGCGGGGCAACGCTACAACCTCATGGAGTTCTGCGGCGGACACAG	120
hypD1	CATGCCATTTTCGGCTTACGGCGTGACCGAAGTGTGCCCCGAGAAGCTGCGGATGATTCAC	180
hypD1_seq	CATGCCATTTTCGGCTTACGGCGTGACCGAAGTGTGCCCCGAGAAGCTGCGGATGATTCAC	180
hypD1	GGGCGGGCTGCCCCAGTGTGCGTGTGCGGATCGGCGCGATTGACCTAGCGCTGCATCTG	240
hypD1_seq	GGGCGGGCTGCCCCAGTGTGCGTGTGCGGATCGGCGCGATTGACCTAGCGCTGCATCTG	240
hypD1	GCGCTGGAGCGCGACGCCATCGTCTGCACCTACGGCGGACACGATGCGGGTGCCGGCCTCG	300
hypD1_seq	GCGCTGGAGCGCGACGCCATCGTCTGCACCTACGGCGGACACGATGCGGGTGCCGGCCTCG	300
hypD1	GGGGGCATGTGCTGTGATTCGGGCCAAGGCGCACGGGGCCGACATCCGCATGGTCTACTCG	360
hypD1_seq	GGGGGCATGTGCTGTGATTCGGGCCAAGGCGCACGGGGCCGACATCCGCATGGTCTACTCG	360
hypD1	GCCGCTGATGCGCTGAAAATTGCGCAGCGGCATCCACAGCGCGAGGTGGTGTTCCTTGCC	420
hypD1_seq	GCCGCTGATGCGCTGAAAATTGCGCAGCGGCATCCACAGCGCGAGGTGGTGTTCCTTGCC	420
hypD1	ATTGGCTTCGAGACTACAACGCCCTCAACTGCGCTGATTATTCGCGAGGCGAAGGCGCGC	480
hypD1_seq	ATTGGCTTCGAGACTACAACGCCCTCAACTGCGCTGATTATTCGCGAGGCGAAGGCGCGC	480
hypD1	CAGGTGGATAAATTCAGTGTGTGTGTGTTGCCACGTGCTTACGCCGTGCGCCATTACCCAC	540
hypD1_seq	CAGGTGGATAAATTCAGTGTGTGTGTGTTGCCACGTGCTTACGCCGTGCGCCATTACCCAC	540
hypD1	ATCCTGGAGTCGCGCCGAGGTGCGCGACTATGGCACTGTGCCCATCGACGGATTCTGTGGG	600
hypD1_seq	ATCCTGGAGTCGCGCCGAGGTGCGCGACTATGGCACTGTGCCCATCGACGGATTCTGTGGG	600
hypD1	CCGGCTCATGTGAGTATCGTGATCGGTACCGGCCCTATGAGCATTTTTCACGCGAGTAC	660
hypD1_seq	CCGGCTCATGTGAGTATCGTGATCGGTACCGGCCCTATGAGCATTTTTCACGCGAGTAC	660
hypD1	GGTAAGCCGGTGGTGATCGCAGGCTTCGAGCCGCTCGATGTGATGCAAGCCATTCTGATG	720
hypD1_seq	GGTAAGCCGGTGGTGATCGCAGGCTTCGAGCCGCTCGATGTGATGCAAGCCATTCTGATG	720
hypD1	TTGGTACGACAAGTCAACAGCGGACGCGCAGAGGTGGAAAATGAGTTCGTGCGCGCTGTC	780
hypD1_seq	TTGGTACGACAAGTCAACAGCGGACGCGCAGAGGTGGAAAATGAGTTCGTGCGCGCTGTC	780
hypD1	ACCCGCGATGGCAACGAGAGCGCGCAGGCCATGGTGTGCGAAGTGTTCGAGCTGCGGCCG	840
hypD1_seq	ACCCGCGATGGCAACGAGAGCGCGCAGGCCATGGTGTGCGAAGTGTTCGAGCTGCGGCCG	840
hypD1	TCTTTCGAGTGGCGAGGACTCGGCGAGGTGCCATATAGCGCCTTGCGCATCCGCGCGCAG	900
hypD1_seq	TCTTTCGAGTGGCGAGGACTCGGCGAGGTGCCATATAGCGCCTTGCGCATCCGCGCGCAG	900
hypD1	TTTGCGCGTTTCGACGCTGAGCAACGCTTCGATCTGCGCTACCGGCCGGTGCCCTGACAAT	960
hypD1_seq	TTTGCGCGTTTCGACGCTGAGCAACGCTTCGATCTGCGCTACCGGCCGGTGCCCTGACAAT	960
hypD1	AAGGCTTGCGAATGCGGCGCGATCTTGCGTGGCGTCAAGAAGCCAACCGACTGCAAGCTG	1020
hypD1_seq	AAGGCTTGCGAATGCGGCGCGATCTTGCGTGGCGTCAAGAAGCCAACCGACTGCAAGCTG	1020
hypD1	TTTCGCTACCGTCTGCACCCCGGAGAATCCGATGGGGTCTGTCATGGTATCCAGCGAAGGT	1080
hypD1_seq	TTTCGCTACCGTCTGCACCCCGGAGAATCCGATGGGGTCTGTCATGGTATCCAGCGAAGGT	1080
hypD1	GCCTGCGCCGCGCACTATTCGTATGGGCGGTTCAAGGATATCCCTTGGTGGCAGCATGA	1140
hypD1_seq	GCCTGCGCCGCGCACTATTCGTATGGGCGGTTCAAGGATATCCCTTGGTGGCAGCATGA	1140

Abb. VI.16 – Nukleinsäure-Sequenzalignement für kloniertes *hypD1* mit der genom-annotierten Sequenz. hypD1 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG016; [236]); hypD1_seq = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hypD1* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

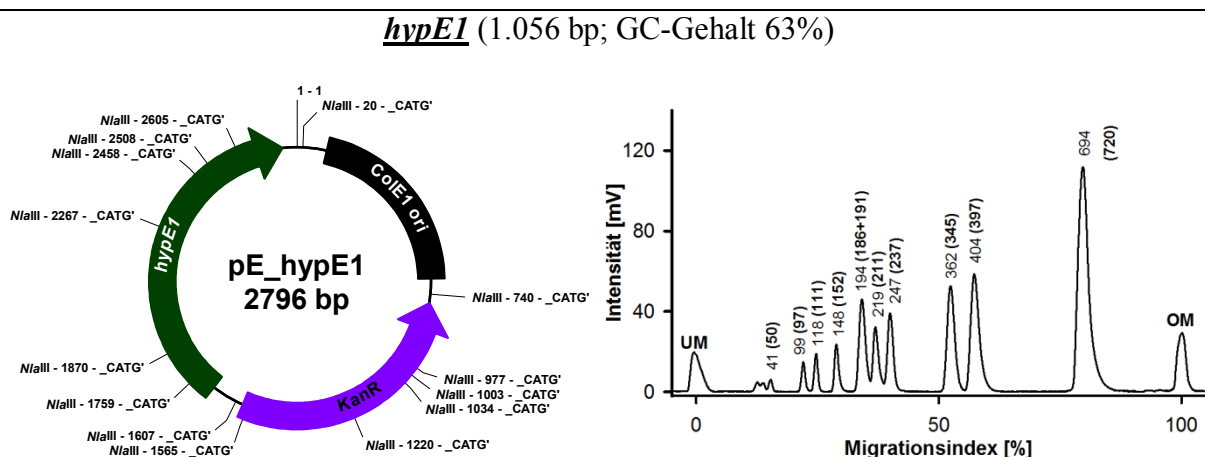


Abb. VI.17 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hypE1*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hypE1      ATGAGCGGCACCGTTAACTGGGCTATCAACGGCCCCCTGAACATCAAGAGCGGCAGAATC 60
hypE1_seq  ATGAGCGGCACCGTTAACTGGGCTATCAACGGCCCCCTGAACATCAAGAGCGGCAGAATC 60
hypE1      GACATGGGCGACGGCGCGGGGGGGCGCGACGCGCACAACTTATCCAGGAAGTGTTCGTT 120
hypE1_seq  GACATGGGCGACGGCGCGGGGGGGCGCGACGCGCACAACTTATCCAGGAAGTGTTCGTT 120
hypE1      GCTGCGTTTACAAATGAGTGGCTGCGCCAGGGCAACGACGAGCGGCTTTCGCCATGCT 180
hypE1_seq  GCTGCGTTTACAAATGAGTGGCTGCGCCAGGGCAACGACGAGCGGCTTTCGCCATGCT 180
hypE1      GCCGGGGCCAGAATGGTGATGGCCACCGACGCGCACGTGGTGTCGCCGCTATTCTTCCCC 240
hypE1_seq  GCCGGGGCCAGAATGGTGATGGCCACCGACGCGCACGTGGTGTCGCCGCTATTCTTCCCC 240
hypE1      GGGGGTGACATCGGTAGCCTGTCGGTGACGGGACCACTTAACGATGTGGCGATGGCCGGT 300
hypE1_seq  GGGGGTGACATCGGTAGCCTGTCGGTGACGGGACCACTTAACGATGTGGCGATGGCCGGT 300
hypE1      GCCAAACCGCTGTATCTGGCCGCGAGTTTCATCTCGAGGAAGGGTTTCGGCTAGCGGAT 360
hypE1_seq  GCCAAACCGCTGTATCTGGCCGCGAGTTTCATCTCGAGGAAGGGTTTCGGCTAGCGGAT 360
hypE1      CTTAAGCGCATTTGTCGAATCGATGGCCGGGGCTGCGCGTGAGGCTGGCGTGCTATCGTG 420
hypE1_seq  CTTAAGCGCATTTGTCGAATCGATGGCCGGGGCTGCGCGTGAGGCTGGCGTGCTATCGTG 420
hypE1      ACGGGTGACACGAAAGTGGTCGAGCAAGGCAAGGGTGATGGCGTATTCATTACCACTACC 480
hypE1_seq  ACGGGTGACACGAAAGTGGTCGAGCAAGGCAAGGGTGATGGCGTATTCATTACCACTACC 480
hypE1      GCGGTCGGCGTGGTGCCAGCGGGCATTTCTAATCGACGGCGCGGGGCCAGGCCGGCGAC 540
hypE1_seq  GCGGTCGGCGTGGTGCCAGCGGGCATTTCTAATCGACGGCGCGGGGCCAGGCCGGCGAC 540
hypE1      GCTATTCTGCTCTCTGGCACTATGGGGGAGCATGGCGTAGCGATCCTGTCCAACGCGAG 600
hypE1_seq  GCTATTCTGCTCTCTGGCACTATGGGGGAGCATGGCGTAGCGATCCTGTCCAACGCGAG 600
hypE1      TCGCTTGAATTTGACACTGAGATCCGCTCGGACAGCGCGCGCTGCACGACTTGGTGGCA 660
hypE1_seq  TCGCTTGAATTTGACACTGAGATCCGCTCGGACAGCGCGCGCTGCACGACTTGGTGGCA 660
hypE1      CAGATGCTGCGCGTGGTGCCGGGGTACGAGTGCTGCGGGATCCTACGCGCGCGGACTG 720
hypE1_seq  CAGATGCTGCGCGTGGTGCCGGGGTACGAGTGCTGCGGGATCCTACGCGCGCGGACTG 720
hypE1      GCGACCACGCTCAACGAAATTTCCAGTCAATCGGGAGTGGGCATGGTGTGGACGAAGCG 780
hypE1_seq  GCGACCACGCTCAACGAAATTTCCAGTCAATCGGGAGTGGGCATGGTGTGGACGAAGCG 780
hypE1      GCGATCCCCGCTCTGCCACAGGTGGACGCGGCATGCGAGCTGCTCGGGCTTGATCCGCTG 840
hypE1_seq  GCGATCCCCGCTCTGCCACAGGTGGACGCGGCATGCGAGCTGCTCGGGCTTGATCCGCTG 840
hypE1      TACGTGGCGAACGAAGGTAAATTTGGTTGCCATTTGCGCAGCTGCGGACGCGGATGCCCTG 900
hypE1_seq  TACGTGGCGAACGAAGGTAAATTTGGTTGCCATTTGCGCAGCTGCGGACGCGGATGCCCTG 900
hypE1      CTTGCCGCCATGCGGGGGCATCCGCTCGGTGCGGAGGCACGGCGCATCGGAGAGGTCATC 960
hypE1_seq  CTTGCCGCCATGCGGGGGCATCCGCTCGGTGCGGAGGCACGGCGCATCGGAGAGGTCATC 960
hypE1      GAGGACGGGGCGCCACTTTGTGAGATGCGCACAAAATTCGGCGGGATGCGCGTGGTGGAC 1020
hypE1_seq  GAGGACGGGGCGCCACTTTGTGAGATGCGCACAAAATTCGGCGGGATGCGCGTGGTGGAC 1020
hypE1      TGGCTGTCCGGCGAGCAGCTTCCGCGCATTTGTTGA 1056
hypE1_seq  TGGCTGTCCGGCGAGCGTTCCGCGCATTTGTTGA 1056

```

Abb. VI.18 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypE1* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypE1* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG017; [236]); *hypE1_seq* = Sequenzierungsergebnis für den analysierten pF-*hypE1* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

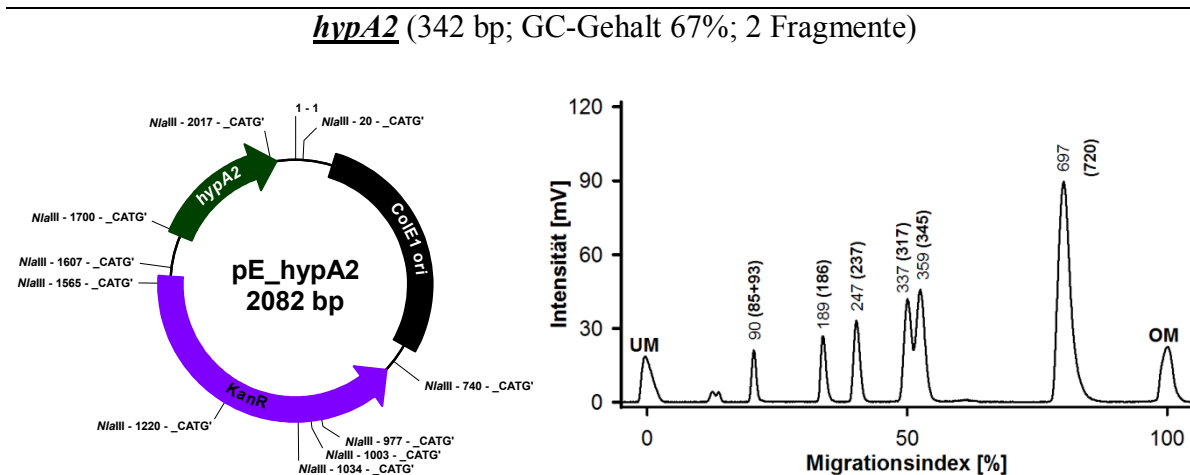


Abb. VI.19 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdau von pE-*hypA2*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hypA2      ATGCATGAGATGTCGCTGGCCGTGGGTGTGCTGCGAGATCGTCGAGGACGTGGCGCAGCGC 60
hypA2_merge ATGCATGAGATGTCGCTGGCCGTGGGTGTGCTGCGAGATCGTCGAGGACGTGGCGCAGCGC 60
hypA2      GACGGTTTTTCCCGCGTAACGGCAGTACGGCTGGAGATCGGCCGGCTGTCCAGTATCGAG 120
hypA2_merge GACGGTTTTTCCCGCGTAACGGCAGTACGGCTGGAGATCGGCCGGCTGTCCAGTATCGAG 120
hypA2      CCGGAAGCGCTGCGCTTCTGCTTCGAGGAGGTAGTGCAGCGGAGTGTGGCTGACGGCGCG 180
hypA2_merge CCGGAAGCGCTGCGCTTCTGCTTCGAGGAGGTAGTGCAGCGGAGTGTGGCTGACGGCGCG 180
hypA2      CGGCTGGAGATCGTGGACACCCCGGTGCCGCTGGTGCCTGCACTGCAGCGAGCGGTG 240
hypA2_merge CGGCTGGAGATCGTGGACACCCCGGTGCCGCTGGTGCCTGCACTGCAGCGAGCGGTG 240
hypA2      GCGATCGGAGCGCTGTACGATCCCTGCCCGCAGTGCAGCGGCTACCAAGTGCAGCCCACT 300
hypA2_merge GCGATCGGAGCGCTGTACGATCCCTGCCCGCAGTGCAGCGGCTACCAAGTGCAGCCCACT 300
hypA2      GCGGACGCGAAATGCGCGTCATGGATCTGGAAGTGGCGTGA 342
hypA2_merge GCGGACGCGAAATGCGCGTCATGGATCTGGAAGTGGCGTGA 342

```

Abb. VI.20 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypA2* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypA2* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG094; [236]); *hypA2_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hypA2.1* und pF-*hypA2.2* Klon. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen **Basenaustausch** zur Eliminierung der **Esp31-Schnittstelle** (siehe Tabelle III.1).

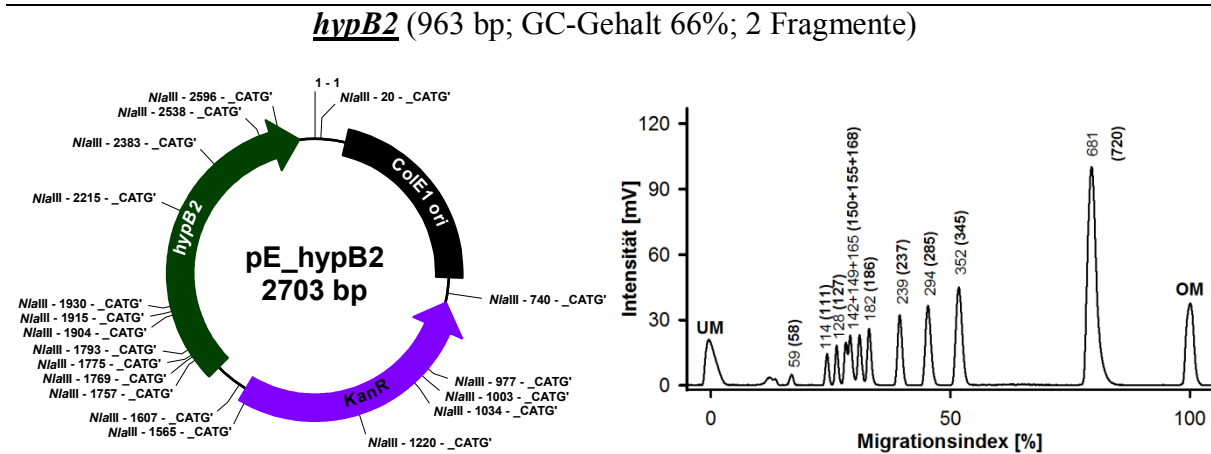


Abb. VI.21 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdau von pE-*hypB2*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

<i>hypB2</i>	ATGTGCACCAACTGTGGCTGCGCCGCGCGGCGAAACCCGCATCGAAGGCCAGGAGCTGGAG	60
<i>hypB2_merge</i>	ATGTGCACCAACTGTGGCTGCGCCGCGCGGCGAAACCCGCATCGAAGGCCAGGAGCTGGAG	60
<i>hypB2</i>	CATGTGACGACGATGCGCATGCCGACGGCACCCTCCATGGCCACGCCCCCATCATCAC	120
<i>hypB2_merge</i>	CATGTGACGACGATGCGCATGCCGACGGCACCCTCCATGGCCACGCCCCCATCATCAC	120
<i>hypB2</i>	GCGGACGACGATCAGACCAACGGCCCTGCCTACCGTGCCGTGCGCGGTACTGACCATCTG	180
<i>hypB2_merge</i>	GCGGACGACGATCAGACCAACGGCCCTGCCTACCGTGCCGTGCGCGGTACTGACCATCTG	180
<i>hypB2</i>	CATTACGGTCACGGACCCGCTGGTGCCCATGCCCAGGCATGAGCCAGGCGCGCATGGTG	240
<i>hypB2_merge</i>	CATTACGGTCACGGACCCGCTGGTGCCCATGCCCAGGCATGAGCCAGGCGCGCATGGTG	240
<i>hypB2</i>	AAGATCGAGCAGGACATCCTGGGCAAGAACACGCCCTACGCGGCGCAGAACCGCGCTGG	300
<i>hypB2_merge</i>	AAGATCGAGCAGGACATCCTGGGCAAGAACACGCCCTACGCGGCGCAGAACCGCGCTGG	300
<i>hypB2</i>	TTGACGAGCAGCGCGTGTTCGCGCTGAACCTTGGGCGGCTCCGGGAAGACC	360
<i>hypB2_merge</i>	TTGACGAGCAGCGCGTGTTCGCGCTGAACCTTGGGCGGCTCCGGGAAGACC	360
<i>hypB2</i>	ACCCTGCTGGTGCGCAACATCGAGGCGCTGAAGTCCACCTCCAGGCTGGCGCTCATCGAA	420
<i>hypB2_merge</i>	ACCCTGCTGGTGCGCAACATCGAGGCGCTGAAGTCCACCTCCAGGCTGGCGCTCATCGAA	420
<i>hypB2</i>	GCGGACGACGACTTCCTTCGATGCCGAGCGCATCCGCGCCACCGCGCTGCAGGCGCTG	480
<i>hypB2_merge</i>	GCGGACGACGACTTCCTTCGATGCCGAGCGCATCCGCGCCACCGCGCTGCAGGCGCTG	480
<i>hypB2</i>	CAGATCAACACCGGCAAGGGCTGCCACCTGGATGCCACATGGTGGGCCACGCGCTGGAG	540
<i>hypB2_merge</i>	CAGATCAACACCGGCAAGGGCTGCCACCTGGATGCCACATGGTGGGCCACGCGCTGGAG	540
<i>hypB2</i>	AAACTGCGCGCGAGGACGAGAGCTGCTGCTGATCGAGAACGTGGGCAACCTGGTCTGC	600
<i>hypB2_merge</i>	AAACTGCGCGCGAGGACGAGAGCTGCTGCTGATCGAGAACGTGGGCAACCTGGTCTGC	600
<i>hypB2</i>	CCTTCGGCCTTCGACCTGGGCGAAGCCACAAGGTGGTGATCCTTTCGGTCAACGAAGGG	660
<i>hypB2_merge</i>	CCTTCGGCCTTCGACCTGGGCGAAGCCACAAGGTGGTGATCCTTTCGGTCAACGAAGGG	660
<i>hypB2</i>	GAGGACAAGCCCCTGAAATATCCTGACATGTTCCGCGCCGCCAGCCTGATGCTGCTCAAC	720
<i>hypB2_merge</i>	GAGGACAAGCCCCTGAAATATCCTGACATGTTCCGCGCCGCCAGCCTGATGCTGCTCAAC	720
<i>hypB2</i>	AAGTGCACCTGCTGCCGACCTGTCTTCGACGTGGAGAGGGCCATCGAGTATGCGAAG	780
<i>hypB2_merge</i>	AAGTGCACCTGCTGCCGACCTGTCTTCGACGTGGAGAGGGCCATCGAGTATGCGAAG	780
<i>hypB2</i>	CGGGTGAATCCGGACCTGCACGTGATCCGGACCTCGTCCGCCACCGGTGAAGGCTTCGAC	840
<i>hypB2_merge</i>	CGGGTGAATCCGGACCTGCACGTGATCCGGACCTCGTCCGCCACCGGTGAAGGCTTCGAC	840
<i>hypB2</i>	GCATGGCTGACGTGGATTGCCGATGGCTGGCCGGCCAGGCCGCGAGGCCAGCAGAGC	900
<i>hypB2_merge</i>	GCATGGCTGACGTGGATTGCCGATGGCTGGCCGGCCAGGCCGCGAGGCCAGCAGAGC	900
<i>hypB2</i>	ATGGAGCTACTGCGCAGCCGATCGCCGGCTGGAAGCGCAACTGGCGGCGCTCAAGGTG	960
<i>hypB2_merge</i>	ATGGAGCTACTGCGCAGCCGATCGCCGGCTGGAAGCGCAACTGGCGGCGCTCAAGGTG	960
<i>hypB2</i>	TAG 963	
<i>hypB2_merge</i>	TAG 963	

Abb. VI.22 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypB2* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypB2* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG095; [236]); *hypB2_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hypB2.1* und pF-*hypB2.2* Klon. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen **Basenaustausch** zur Eliminierung der **Esp31-Schnittstelle** (siehe Tabelle III.1).

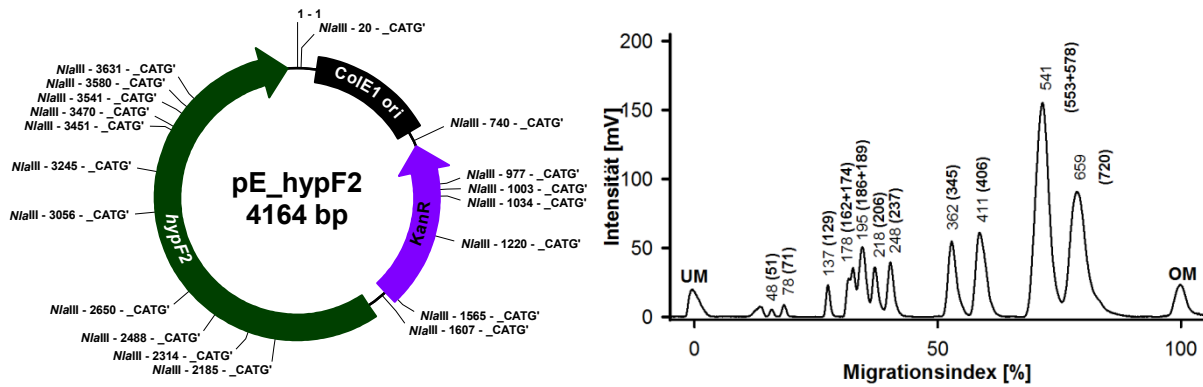
hypF2 (2.424 bp; GC-Gehalt 72%; 3 Fragmente)

Abb. VI.23 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hypF2*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hypF2	ATGCTGATGCCGCGCCGTCCTCGCAATCCGCGCACCGTCCGCATCCGCATCCGCGTGC	60
hypF2_merge	ATGCTGATGCCGCGCCGTCCTCGCAATCCGCGCACCGTCCGCATCCGCATCCGCGTGC	60
hypF2	GGCGTCGTGCAGGGCGTGGGCTTCCGGCCCTTCGTCTATCGCTTGGCGCGGAGCTGGGC	120
hypF2_merge	GGCGTCGTGCAGGGCGTGGGCTTCCGGCCCTTCGTCTATCGCTTGGCGCGGAGCTGGGC	120
hypF2	CTCGCCGGCTGGGTGCGCAACGACGCGCGCGCGCTGGACATCGAGGCCAAGGGAGCGCC	180
hypF2_merge	CTCGCCGGCTGGGTGCGCAACGACGCGCGCGCGCTGGACATCGAGGCCAAGGGAGCGCC	180
hypF2	GCGGCCCTCGTCGAGCTGCGCGAGCGCTGCGCCGCGACGCGCGCCCTTGGCGCGGGTG	240
hypF2_merge	GCGGCCCTCGTCGAGCTGCGCGAGCGCTGCGCCGCGACGCGCGCCCTTGGCGCGGGTG	240
hypF2	GATGAGATCGGTGAGGAACGCTGTGCGGCACAGGTTGACGCCGACGGCTTTGCCATCCTC	300
hypF2_merge	GATGAGATCGGTGAGGAACGCTGTGCGGCACAGGTTGACGCCGACGGCTTTGCCATCCTC	300
hypF2	GAGAGCAGCCGTTCGATGCGCGCGTGACACCGCCATCGGCCACGACACGCGCGTATGC	360
hypF2_merge	GAGAGCAGCCGTTCGATGCGCGCGTGACACCGCCATCGGCCACGACACGCGCGTATGC	360
hypF2	CCCGACTGCCTGGCGGAGCTGTTGACCCCGCGAACCAGCGCTACCGCTACGCGCTTCATC	420
hypF2_merge	CCCGACTGCCTGGCGGAGCTGTTGACCCCGCGAACCAGCGCTACCGCTACGCGCTTCATC	420
hypF2	AACGTGACCCAGTGGCGGCCGCGCTACACCTGACGCTGGCGCTGCCCTACGACCGCGCC	480
hypF2_merge	AACGTGACCCAGTGGCGGCCGCGCTACACCTGACGCTGGCGCTGCCCTACGACCGCGCC	480
hypF2	ACCACGAGCATGGCGCGCTTCCCGAGTGGCGGCCCTGTCTCGACGAGTATAACGACCC	540
hypF2_merge	ACCACGAGCATGGCGCGCTTCCCGAGTGGCGGCCCTGTCTCGACGAGTATAACGACCC	540
hypF2	GAGCATCGCCGCTTCCACGCGAGCCCAACGCGCTGTCCGACTGTGGCCCGAGCTGGCG	600
hypF2_merge	GAGCATCGCCGCTTCCACGCGAGCCCAACGCGCTGTCCGACTGTGGCCCGAGCTGGCG	600
hypF2	CTGCTCAATGCCAGGGCATGCCGCTCGAGGACGTTGATCCGATCGCCGAGCGGTGGCG	660
hypF2_merge	CTGCTCAATGCCAGGGCATGCCGCTCGAGGACGTTGATCCGATCGCCGAGCGGTGGCG	660
hypF2	CGCCTGCAGCGGGCGAGATCGTCGCCATCAAGGGCCTTGGGGCTTCCATCTCGCTGT	720
hypF2_merge	CGCCTGCAGCGGGCGAGATCGTCGCCATCAAGGGCCTTGGGGCTTCCATCTCGCTGT	720
hypF2	GACGCGCAATGCCGAGCGGTGGCGCGGCTGCGCAGCCGCAAGCAGCGGAGGAGAAG	780
hypF2_merge	GACGCGCAATGCCGAGCGGTGGCGCGGCTGCGCAGCCGCAAGCAGCGGAGGAGAAG	780
hypF2	CCCTTCGCGCTCATGGTCGCGAACCCTGGCGAGCGCGCGCAGTGGGGCGACATCGGCGAG	840
hypF2_merge	CCCTTCGCGCTCATGGTCGCGAACCCTGGCGAGCGCGCGCAGTGGGGCGACATCGGCGAG	840
hypF2	GGTGAAGCGGCCCTGCTCACGGCGTCGGAGCGGCCCATCGTTCTGCTGCGCAAGCGCAGC	900
hypF2_merge	GGTGAAGCGGCCCTGCTCACGGCGTCGGAGCGGCCCATCGTTCTGCTGCGCAAGCGCAGC	900
hypF2	GGCGTCGATGGCGCGTTCGCGGGCGTGGCGCGGGAGTGGTCTGGCTGGCGCTCATGCTG	960
hypF2_merge	GGCGTCGATGGCGCGTTCGCGGGCGTGGCGCGGGAGTGGTCTGGCTGGCGCTCATGCTG	960
hypF2	CGGTACAGCCGCTCCAGTATCTGCTGTTCCACGAGCGCGCTGGCGCGCCCGAGGGCCTC	1020
hypF2_merge	CGGTACAGCCGCTCCAGTATCTGCTGTTCCACGAGCGCGCTGGCGCGCCCGAGGGCCTC	1020
hypF2	GGCTGGCTCGCCAGCGCAGTCTGCTGGTGTGTTGATGACGAGCGCAACCCGCGCGC	1080
hypF2_merge	GGCTGGCTCGCCAGCGCAGTCTGCTGGTGTGTTGATGACGAGCGCAACCCGCGCGC	1080
hypF2	GAGCCCTTGGTCACCGCAACGACGAGCGGGCGCAGCGGCTCACTGGCATCGCCAGCGCT	1140
hypF2_merge	GAGCCCTTGGTCACCGCAACGACGAGCGGGCGCAGCGGCTCACTGGCATCGCCAGCGCT	1140
hypF2	TTCTTGTCCACGATCGCGAGATCCTGGTGGCTTGTGACGATTCCGTTGGTGAGGGGCGAC	1200
hypF2_merge	TTCTTGTCCACGATCGCGAGATCCTGGTGGCTTGTGACGATTCCGTTGGTGAGGGGCGAC	1200
hypF2	GGCGAACCAGCGCCTCACGTCCAGTTTATTCGCCGCGCGCGGGTTACACGCCGCGGGCG	1260
hypF2_merge	GGCGAACCAGCGCCTCACGTCCAGTTTATTCGCCGCGCGCGGGTTACACGCCGCGGGCG	1260
hypF2	ATCAAGCTGGCGCGCAGCGGCCCTCGGTGCTGGCGCTGGGCGGCTCCTTCAAGAACAG	1320
hypF2_merge	ATCAAGCTGGCGCGCAGCGGCCCTCGGTGCTGGCGCTGGGCGGCTCCTTCAAGAACAG	1320
hypF2	GTGTGCTGACGCGCGCGCAGAGGCGCTTCTGATGATGTGGCGATCTCGGCAAC	1380
hypF2_merge	GTGTGCTGACGCGCGCGCAGAGGCGCTTCTGATGATGTGGCGATCTCGGCAAC	1380
hypF2	GCTGCCACCTGCGAGGCCCTGATCGAGGCGGTGGCCCATCTGCAGCGGGTGTGGAGATC	1440
hypF2_merge	GCTGCCACCTGCGAGGCCCTGATCGAGGCGGTGGCCCATCTGCAGCGGGTGTGGAGATC	1440
hypF2	CGGCCGAGCTGTGCGCCACGATCTGCATCCGACTTCTTACGACACAGCCACGCGAGC	1500
hypF2_merge	CGGCCGAGCTGTGCGCCACGATCTGCATCCGACTTCTTACGACACAGCCACGCGAGC	1500
hypF2	GAGCTGGCGGGCAATGGGGGTCCTGCGCTGCGCTGCGAGCACCATCATGCCATATT	1560
hypF2_merge	GAGCTGGCGGGCAATGGGGGTCCTGCGCTGCGCTGCGAGCACCATCATGCCATATT	1560
hypF2	CGGGCGGTGCTGGCGAGCAGCGCTCGGACGAACCCGCCATCGGCTGGCGCTGGACGCG	1620
hypF2_merge	CGGGCGGTGCTGGCGAGCAGCGCTCGGACGAACCCGCCATCGGCTGGCGCTGGACGCG	1620
hypF2	GTCGGCTGGCGACGAGCGGCGAGCGTGGGGTGGCGAATGCTGCTGGTGGACGCGCGC	1680
hypF2_merge	GTCGGCTGGCGACGAGCGGCGAGCGTGGGGTGGCGAATGCTGCTGGTGGACGCGCGC	1680
hypF2	GCCTGTAAGCGCTCGGTCACTTGGCGAGCTGGCGCTACCTGGCGGCGATCGCGCGCGC	1740
hypF2_merge	GCCTGTAAGCGCTCGGTCACTTGGCGAGCTGGCGCTACCTGGCGGCGATCGCGCGCGC	1740
hypF2	CGGGAGCCCTGGCGCATGGCGCTGCGGCGCTGCATGCGATGGGCGCGCGGAGAGATC	1800
hypF2_merge	CGGGAGCCCTGGCGCATGGCGCTGCGGCGCTGCATGCGATGGGCGCGCGGAGAGATC	1800
hypF2	GAGGGCGCTTCCCGCGCAGCGGGGGCGCGATGGTGAACCGCATGCTGGCCAGCGG	1860


```

hypF2_merge      GAGGGGCGCTTCCC GCGGCA GCCGGGGCGCCGATGGTGAACCGCATGCTGGCCAGCGG 1860
hypF2            CTTAACGCGCCCTCTCTCCAGCATGGGCGGCTGGTTCGACGCGCGCGCGGCTGCTC 1920
hypF2_merge      CTTAACGCGCCCTCTCTCCAGCATGGGCGGCTGGTTCGACGCGCGCGCGGCTGCTC 1920
hypF2            GGCACACGGGAAACCATGGCTACGAGGGGCGAGCGCGCATGCTGCTGAAGGTTGGCC 1980
hypF2_merge      GGCACACGGGAAACCATGGCTACGAGGGGCGAGCGCGCATGCTGCTGAAGGTTGGCC 1980
hypF2            GAGAGCTGGGGCGAGCAACCGTCGCGGGCGCGCCCAAGACGGTGTCTACTCCCTCGGG 2040
hypF2_merge      GAGAGCTGGGGCGAGCAACCGTCGCGGGCGCGCCCAAGACGGTGTCTACTCCCTCGGG 2040
hypF2            GGGGTGCCGCGCAGCGCGGGGTACATACAAGCGCTGGCGCTGCCCGATGCTTGGCGC 2100
hypF2_merge      GGGGTGCCGCGCAGCGCGGGGTACATACAAGCGCTGGCGCTGCCCGATGCTTGGCGC 2100
hypF2            ATCGATGCGGGCAACACCTGGATCTGCTGCCGCTGCTCGAGCGCTGTCGCCGAAACG 2160
hypF2_merge      ATCGATGCGGGCAACACCTGGATCTGCTGCCGCTGCTCGAGCGCTGTCGCCGAAACG 2160
hypF2            AATGCCGCGCGCGCGCGGCACAGTTCCACGCCACCTGGTGGCGCGCTGGAAGCCTGG 2220
hypF2_merge      AATGCCGCGCGCGCGCGGCACAGTTCCACGCCACCTGGTGGCGCGCTGGAAGCCTGG 2220
hypF2            ACCGTCGCGACCGTCCAGGTACCGCGCTGCGCACGGTCTCTTCGGCGCGCGCTGCTTC 2280
hypF2_merge      ACCGTCGCGACCGTCCAGGTACCGCGCTGCGCACGGTCTCTTCGGCGCGCGCTGCTTC 2280
hypF2            CTCAACCACATCTCTGCCCGCAACCTGTGCCGCGCTGGCGCGCGGGGACTGACCGTG 2340
hypF2_merge      CTCAACCACATCTCTGCCCGCAACCTGTGCCGCGCTGGCGCGCGGGGACTGACCGTG 2340
hypF2            CTGACAGCGCGCGAGCTGCCGCCAATGACGGAGGCATTGCCCTCGGTACGGTCTGGGTG 2400
hypF2_merge      CTGACAGCGCGCGAGCTGCCGCCAATGACGGAGGCATTGCCCTCGGTACGGTCTGGGTG 2400
hypF2            GCGCTGACGCGGGCGCCAACTGA 2424
hypF2_merge      GCGCTGCAACGAGCAACAACTGA 2424

```

Abb. VI.24 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypF2* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypF2* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG096; [236]); *hypF2_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hypF2*.1, pF-*hypF2*.2 und pF-*hypF2*.3 Klone. Die Sequenz enthält die vorgenannten **Basenaustausche** zur Eliminierung zweier **Esp3I-Schnittstellen** und zur Reduzierung des hohen 3'-GC-Gehalts (siehe Tabelle III.1). Die ungewollte **Punktmutation an Position 726** ist eine stille Mutation.

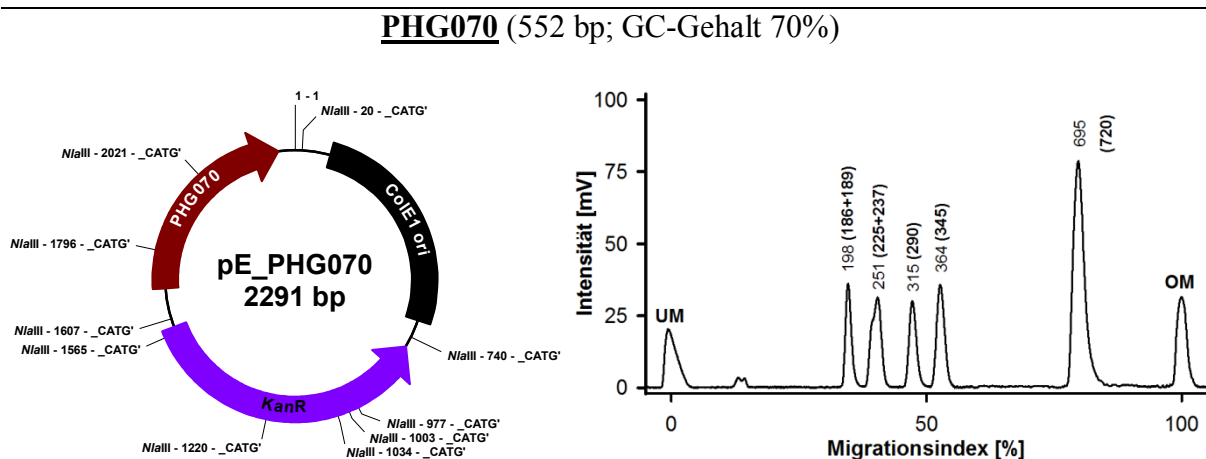


Abb. VI.25 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NaIII*-Verdaus von pE-PHG070. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

PHG070      ATGAGCGGCATCCTGGTCGCGGGCATCGGCAATGTATTCTCGGCGACGACGGCTTTGGG 60
PHG070_seq  ATGAGCGGCATCCTGGTCGCGGGCATCGGCAATGTATTCTCGGCGACGACGGCTTTGGG 60
PHG070      GTCGAAGTGGTGACGCGCTCGGCGCCGCCAGGCCGCGCATGCCTTGCCGCCGTTTCCC 120
PHG070_seq  GTCGAAGTGGTGACGCGCTCGGCGCCGCCAGGCCGCGCATGCCTTGCCGCCGTTTCCC 120
PHG070      GAAGGCGTAGTGGTGGCCGACTTCGGCATCCGCGGCATCGACCTGTGCTACGCGTTGCTC 180
PHG070_seq  GAAGGCGTAGTGGTGGCCGACTTCGGCATCCGCGGCATCGACCTGTGCTACGCGTTGCTC 180
PHG070      GACGGGTGGACGCCGCCATCTGGTCGATGCCACGCAACGCGCGGGGCGCCCGGCAGC 240
PHG070_seq  GACGGGTGGACGCCGCCATCTGGTCGATGCCACGCAACGCGCGGGGCGCCCGGCAGC 240
PHG070      CTCTATGTGATCGAGTTGCCGATGGACGCGCAGGACGCGCGACGCGCTGGCGATCCGTAC 300
PHG070_seq  CTCTATGTGATCGAGTTGCCGATGGACGCGCAGGACGCGCGACGCGCTGGCGATCCGTAC 300
PHG070      CGCTCACCTGTGCTGATGTCGCGCATGAGATGAATCCGGCCCTCGTGTGCGGGCGCTG 360
PHG070_seq  CGCTCACCTGTGCTGATGTCGCGCATGAGATGAATCCGGCCCTCGTGTGCGGGCGCTG 360
PHG070      CGGATGATGGCGGCACTTGC GCGGACGTTGTTGGTATCGGCTGCGAGCCCGCGACTTC 420
PHG070_seq  CGGATGATGGCGGCACTTGC GCGGACGTTGTTGGTATCGGCTGCGAGCCCGCGACTTC 420
PHG070      GGGCTCGGCGAGGGCGAAGAGGGCGGCTCGGCCCTGAGCGAGCCGTTGGCGGACGCGTG 480
PHG070_seq  GGGCTCGGCGAGGGCGAAGAGGGCGGCTCGGCCCTGAGCGAGCCGTTGGCGGACGCGTG 480
PHG070      GACCGCGCCGTTGCAATGGTCGAGGCAATGGTCGGGCGCAAGGCCGAGCAATTGTATGGA 540
PHG070_seq  GACCGCGCCGTTGCAATGGTCGAGGCAATGGTCGGGCGCAAGGCCGAGCAATTGTATGGA 540
PHG070      CGGCCGCGGTGA 552
PHG070_seq  CGGCCGCGGTGA 552

```

Abb. VI.26 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für das klonierte PHG070-Gen mit der genom-annotierten Sequenz. PHG070 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG070; [236]); PHG070_seq = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-PHG070 Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

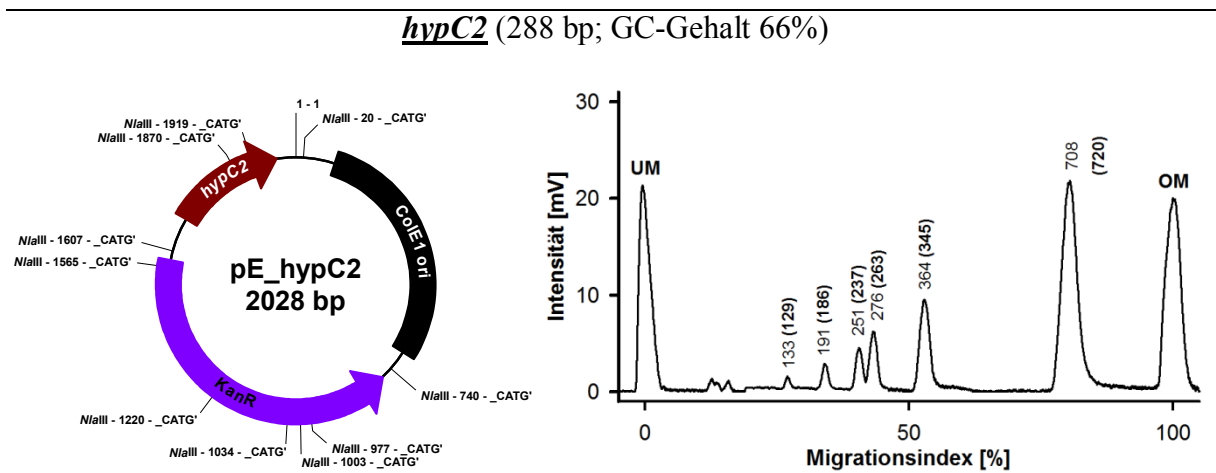


Abb. VI.27 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hypC2*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hypC2	ATGTGCCTAGGTATCCCCGGACAGATCCTGGAAGTGCGCGACGCCCAATGCCTTGGCG	60
hypC2_seq	ATGTGCCTAGGTATCCCCGGACAGATCCTGGAAGTGCGCGACGCCCAATGCCTTGGCG	60
hypC2	ATGGTCGAGGTCGGCGCGCGTGCAGCCTGATCAATATCGCCTTCATCGTGGACGACGAC	120
hypC2_seq	ATGGTCGAGGTCGGCGCGCGTGCAGCCTGATCAATATCGCCTTCATCGTGGACGACGAC	120
hypC2	CACAAGGCCGAGGCTTGTGTGGGTGAATGGGTGCTGGTCCACGTGGGCTTTGCCATGAGC	180
hypC2_seq	CACAAGGCCGAGGCTTGTGTGGGTGAATGGGTGCTGGTCCACGTGGGCTTTGCCATGAGC	180
hypC2	CGCCTGGACGAGGCGGAGGCGCGCGCAGCTGGCGCTGCTGCATGAGCTCGGGATTGCG	240
hypC2_seq	CGCCTGGACGAGGCGGAGGCGCGCGCAGCTGGCGCTGCTGCATGAGCTCGGGATTGCG	240
hypC2	CAGGCCGAGTTCGACGAGATGCGCGCGGGGTGCGCGGCCCGCCATAG	288
hypC2_seq	CAGGCCGAGTTCGACGAGATGCGCGCGGGGTGCGCGGCCCGCCATAG	288

Abb. VI.28 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypC2* mit der genom-annotierten Sequenz. hypC2 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG073; [236]); hypC2_seq = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hypC2* Klon. Die Sequenz enthält die vorgenommenen **Basenaustausche** zur Reduzierung des hohen 3'-GC-Gehalts (siehe Tabelle III.1). Ein GGG-Codons (Glycin) wurde anstelle des Stopp-Codons eingefügt. Dies ermöglicht die 3'-Fusion des ORF mit der StrepII-Tag-Sequenz (C-terminaler StrepII-Tag).

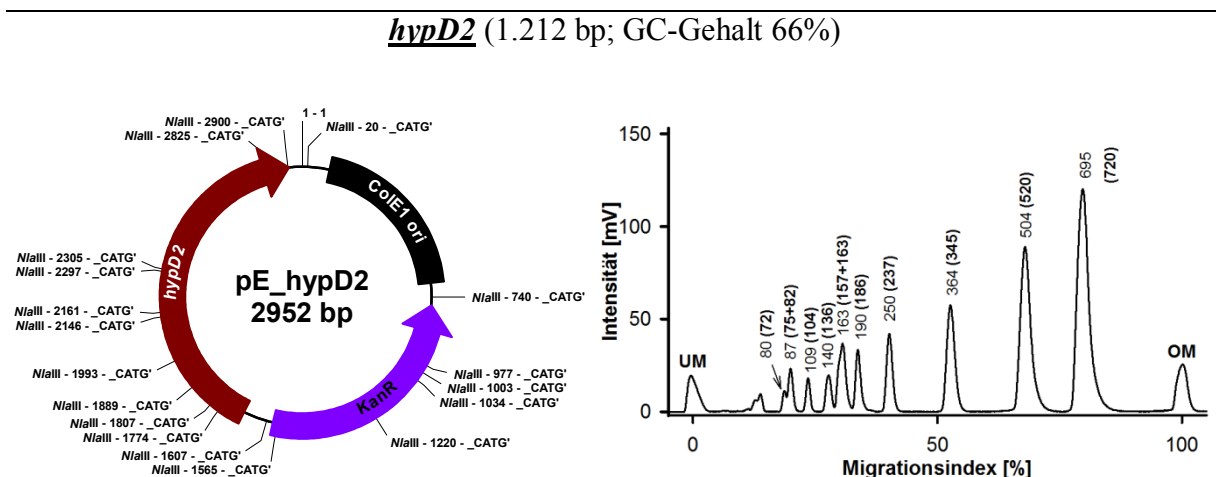


Abb. VI.29 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hypD2*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hypD2	ATGAAGTACGTGACGAATTCGCGATCCCGCAAGGCGCAGGCGCTGGCGCGGGAATC	60
hypD2_seq	ATGAAGTACGTGACGAATTCGCGATCCCGCAAGGCGCAGGCGCTGGCGCGGGAATC	60
hypD2	CGTGATCTGGTGGCAGGCATGGGCGCGCCAGGCGCGCCCGCTGCAGATCATGGAGGTG	120
hypD2_seq	CGTGATCTGGTGGCAGGCATGGGCGCGCCAGGCGCGCCCGCTGCAGATCATGGAGGTG	120
hypD2	TGCGGCGGCCATACGCATACGATTTTCGCTACGGCATCCAGCAACTCTTGCCCGACGAG	180
hypD2_seq	TGCGGCGGCCATACGCATACGATTTTCGCTACGGCATCCAGCAACTCTTGCCCGACGAG	180
hypD2	GTGGAGTTCGTGCATGGCGCGGGGTGCCGGTATGCGTGCTGCCGATGGGCGCGTCGAC	240
hypD2_seq	GTGGAGTTCGTGCATGGCGCGGGGTGCCGGTATGCGTGCTGCCGATGGGCGCGTCGAC	240
hypD2	GACTGCGTGGCGCTGGCGGAGCGCCCGAAGTGATATTACAAACGTTGCGGCGACGCCATG	300
hypD2_seq	GACTGCGTGGCGCTGGCGGAGCGCCCGAAGTGATATTACAAACGTTGCGGCGACGCCATG	300
hypD2	CGCGTGCCCGGCTCCCGCAAAAGCCTGCTCAAGGCCAAGGCGGATGGCGCGCATGTGCGG	360
hypD2_seq	CGCGTGCCCGGCTCCCGCAAAAGCCTGCTCAAGGCCAAGGCGGATGGCGCGCATGTGCGG	360
hypD2	ATGGTCTACTCGCCGATCGACGCGCTGGCGCTCGCGCGCAACCATCCGGACCGCGAAGTG	420
hypD2_seq	ATGGTCTACTCGCCGATCGACGCGCTGGCGCTCGCGCGCAACCATCCGGACCGCGAAGTG	420
hypD2	ATCTTCTTCGGGCTGGGCTTCGAGACCACCATGCCGAGCACCGCCATGACCGTTCTGCGG	480
hypD2_seq	ATCTTCTTCGGGCTGGGCTTCGAGACCACCATGCCGAGCACCGCCATGACCGTTCTGCGG	480
hypD2	GCGCGGCGCGAGGCGTGGCGCAACTTCTCGCTGTTCTGCAACCATCACGATCATCCCG	540
hypD2_seq	GCGCGGCGCGAGGCGTGGCGCAACTTCTCGCTGTTCTGCAACCATCACGATCATCCCG	540
hypD2	ACCATCAAGGCCATTCTCGATTACCTGACCTGCAGATCGACGGCTTCCTCGGTCCGGGC	600
hypD2_seq	ACCATCAAGGCCATTCTCGATTACCTGACCTGCAGATCGACGGCTTCCTCGGTCCGGGC	600
hypD2	CATGTCAGCATGGTGATCGGCACGCAACCTACGAGTTTATCGCCCGGCACTACCGCAAG	660
hypD2	CATGTCAGCATGGTGATCGGCACGCAACCTACGAGTTTATCGCCCGGCACTACCGCAAG	660
hypD2	CCGATCACCGTGGCGGCTTCGAGCGCTGGAGCTGCTGCAGTCGATGTTGATGGTCTCTC	720
hypD2_seq	CCGATCACCGTGGCGGCTTCGAGCGCTGGAGCTGCTGCAGTCGATGTTGATGGTCTCTC	720
hypD2	AGGCAGATCGCGCAGGCGCGTGGCAAGTGGAGAACCAGTACGGACGGATCGTGCCGGCA	780
hypD2_seq	AGGCAGATCGCGCAGGCGCGTGGCAAGTGGAGAACCAGTACGGACGGATCGTGCCGGCA	780
hypD2	GCGGGCAATGCGCAGGCGCTGGCGGCGATTACAGGAAGTGTTCGAGCTGCGCGAGTTCTTC	840
hypD2_seq	GCGGGCAATGCGCAGGCGCTGGCGGCGATTACAGGAAGTGTTCGAGCTGCGCGAGTTCTTC	840
hypD2	GAATGGCGCGGACTGGGCTCGATCGACTTCTCGGGTGTGCGGATGCGCGAGGCATTCTCC	900
hypD2_seq	GAATGGCGCGGACTGGGCTCGATCGACTTCTCGGGTGTGCGGATGCGCGAGGCATTCTCC	900
hypD2	GCGTTCGACGCCGAGCGCAAGTTCACCGTGCCCGACGTCAAGATCGCCGACCCCAAGGCC	960
hypD2_seq	GCGTTCGACGCCGAGCGCAAGTTCACCGTGCCCGACGTCAAGATCGCCGACCCCAAGGCC	960
hypD2	TGCCAGTGGCGGAGGTGCTCAAGGGCGTGATCAAGCCCCATCAATGCAAGGTGTTTCGCG	1020
hypD2_seq	TGCCAGTGGCGGAGGTGCTCAAGGGCGTGATCAAGCCCCATCAATGCAAGGTGTTTCGCG	1020
hypD2	ACCGCTGCACGCCGAGTTCGCGCTGGGGTTCGCTGATGGTCTCGAGCGAGGGCGCCTGC	1080
hypD2_seq	ACCGCTGCACGCCGAGTTCGCGCTGGGGTTCGCTGATGGTCTCGAGCGAGGGCGCCTGC	1080
hypD2	GCGGCGTACTACCATTAAGTTCGCGCATCGACACCTCCCGGCTCGGGCGACATGGCGCGCA	1140
hypD2_seq	GCGGCGTACTACCATTAAGTTCGCGCATCGACACCTCCCGGCTCGGGCGACATGGCGCGCA	1140
hypD2	GCGGCGGGGCAACGGCAACCAAGGATGCGGTGCGCAACGAGCGGGCGCGAGCCGAGGCC	1200
hypD2_seq	GCGGCGGGGCAACGGCAACCAAGGATGCGGTGCGCAACGAGCGGGCGCGAGCCGAGGCC	1200
hypD2	GGCCATGAATGA	1212
hypD2_seq	GGCCATGAATGA	1212

Abb. VI.30 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypD2* mit der genom-annotierten Sequenz. hypD2 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG075; [236]); hypD2_seq = Sequenzierungs-Ergebnis für den analysierten pF-*hypD2* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

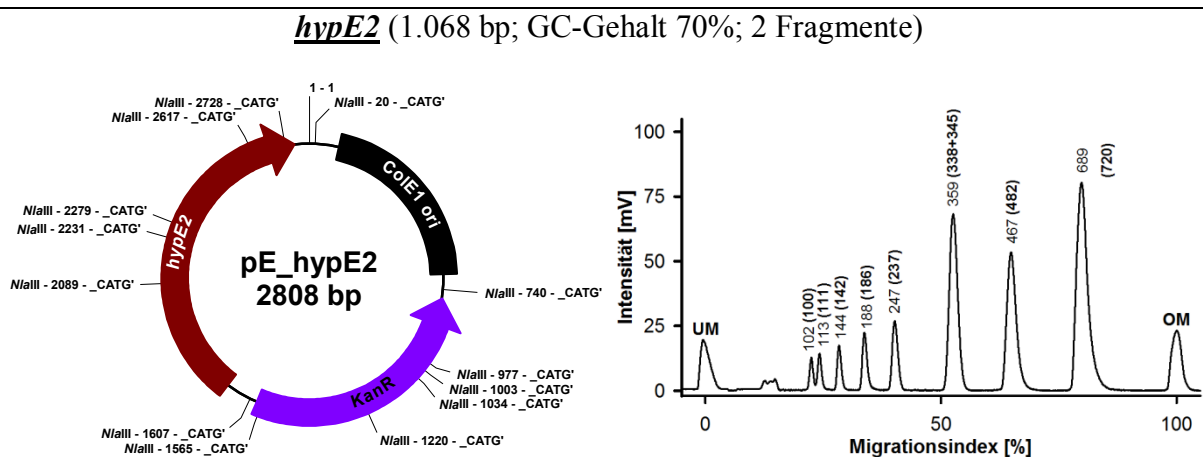


Abb. VI.31 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *Nla*III-Verdaus von pE-*hypE2*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hypE2      ATGAATGACCGTGTTCGGTCCC GCCGGCACGCGCGCGCGCGTGC GGGACACGACCATC 60
hypE2_merge ATGAATGACCGTGTTCGGTCCC GCCGGCACGCGCGCGCGCGTGC GGGACACGACCATC 60
hypE2      AACCTGACCCACGGAAGCGGCGCGCGAGCGATGCGAGACCTGATCGAAGACGTGTTCCGTG 120
hypE2_merge AACCTGACCCACGGAAGCGGCGCGCGAGCGATGCGAGACCTGATCGAAGACGTGTTCCGTG 120
hypE2      AGCACCTTCGACAATCCCGCGCTGGCGCGCTAGAGGACCAAGGCTGTGTTCCCGCTGGTC 180
hypE2_merge AGCACCTTCGACAATCCCGCGCTGGCGCGCTAGAGGACCAAGGCTGTGTTCCCGCTGGTC 180
hypE2      AGCCTGGCAGCCACGCGCACCGGCTGGCCTTACCACCGACAGCTACGTGGTAGATCCG 240
hypE2_merge AGCCTGGCAGCCACGCGCACCGGCTGGCCTTACCACCGACAGCTACGTGGTAGATCCG 240
hypE2      CTGTTCTTTCCCGGGGGCGACATCGGTACGCTTGCCGCGGGGGAAACCGTGAACGACCTC 300
hypE2_merge CTGTTCTTTCCCGGGGGCGACATCGGTACGCTTGCCGCGGGGGAAACCGTGAACGACCTC 300
hypE2      GCGGTGTGCGGCGCGACGCCGCTGTTCTGTCGTGCGGCGTGGTGTGAGGAAAGGCTTG 360
hypE2_merge GCGGTGTGCGGCGCGACGCCGCTGTTCTGTCGTGCGGCGTGGTGTGAGGAAAGGCTTG 360
hypE2      CCGGTGCGACACCTTGCGCGGGTCCGCGCCAGCATGCAGCGCTGCGCGGGGCGAGCCGGC 420
hypE2_merge CCGGTGCGACACCTTGCGCGGGTCCGCGCCAGCATGCAGCGCTGCGCGGGGCGAGCCGGC 420
hypE2      GTCGCGATCGTCACGGGCGACACCAAGGTGGTTCGAGCGCGGCGAGCGGACAGCTGTTT 480
hypE2_merge GTCGCGATCGTCACGGGCGACACCAAGGTGGTTCGAGCGCGGCGAGCGGACAGCTGTTT 480
hypE2      ATCAATACGGCCGGGATCGGCGTGGTGC GCGCGGGCTATCGATCTCCGCGCCCATGCG 540
hypE2_merge ATCAATACGGCCGGGATCGGCGTGGTGC GCGCGGGCTATCGATCTCCGCGCCCATGCG 540
hypE2      CGTGCGGGAGACGCTGGTTCTCGTCAATGGCTATCTTGGCGACCATGGCGCGGCGATCCG 600
hypE2_merge CGTGCGGGAGACGCTGGTTCTCGTCAATGGCTATCTTGGCGACCATGGCGCGGCGATCCG 600
hypE2      GTGGCCCGCCAGCAACTCGCACTTGAGGCCGACCTGCAAGCGACTGCCGCCGCTCAAC 660
hypE2_merge GTGGCCCGCCAGCAACTCGCACTTGAGGCCGACCTGCAAGCGACTGCCGCCGCTCAAC 660
hypE2      GGGCTGGTGC GCGCATGCTCGACGCTGCCCGCATATCCACTGCTTGCGCGACGCCACG 720
hypE2_merge GGGCTGGTGC GCGCATGCTCGACGCTGCCCGCATATCCACTGCTTGCGCGACGCCACG 720
hypE2      CGCGCGCGCGTGGCGACAGTGCTCAACGAGTTGCGCGAGGCTCCGGCGTGGCCATCCGC 780
hypE2_merge CGCGCGCGCGTGGCGACAGTGCTCAACGAGTTGCGCGAGGCTCCGGCGTGGCCATCCGC 780
hypE2      ATCCGCGAGGTGGACGTGCCGCTGCGCGAGGCTGTCAAGGAGCGTGCAGATCTCTCGGG 840
hypE2_merge ATCCGCGAGGTGGACGTGCCGCTGCGCGAGGCTGTCAAGGAGCGTGCAGATCTCTCGGG 840
hypE2      CTGGATCCGCTGTACCTGGCCAACGAAGGCATCTGGTGGCCATAGTGCCCGCGAGGAT 900
hypE2_merge CTGGATCCGCTGTACCTGGCCAACGAAGGCATCTGGTGGCCATAGTGCCCGCGAGGAT 900
hypE2      GCGCGCGCGTGTGGCGGCATGCGCGCGCATCTGATGGCAGGCGAGCGCGCGCCATC 960
hypE2_merge GCGCGCGCGTGTGGCGGCATGCGCGCGCATCTGATGGCAGGCGAGCGCGCGCCATC 960
hypE2      GCGCAAGTGGAGCCGGGGCGCGCGGGCTGGTGGTTCTGCACACCGGCTTTGGCGGGCAG 1020
hypE2_merge GCGCAAGTGGAGCCGGGGCGCGCGGGCTGGTGGTTCTGCACACCGGCTTTGGCGGGCAG 1020
hypE2      CCGGTTGTGGACATGCTGGTGGGCGAGCAGCTGCCGCGGATCTGCTGA 1068
hypE2_merge CCGGTTGTGGACATGCTGGTGGGCGAGCAGCTGCCGCGGATCTGCTGA 1068

```

Abb. VI.32 – Nukleinsäure-Sequenzalignement für kloniertes *hypE2* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypE2* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG076; [236]); *hypE2_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hypE2.1* und pF-*hypE2.2* Klon. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen **Basenaustausch** zur Eliminierung der **Esp31-Schnittstelle** (siehe Tabelle III.1).

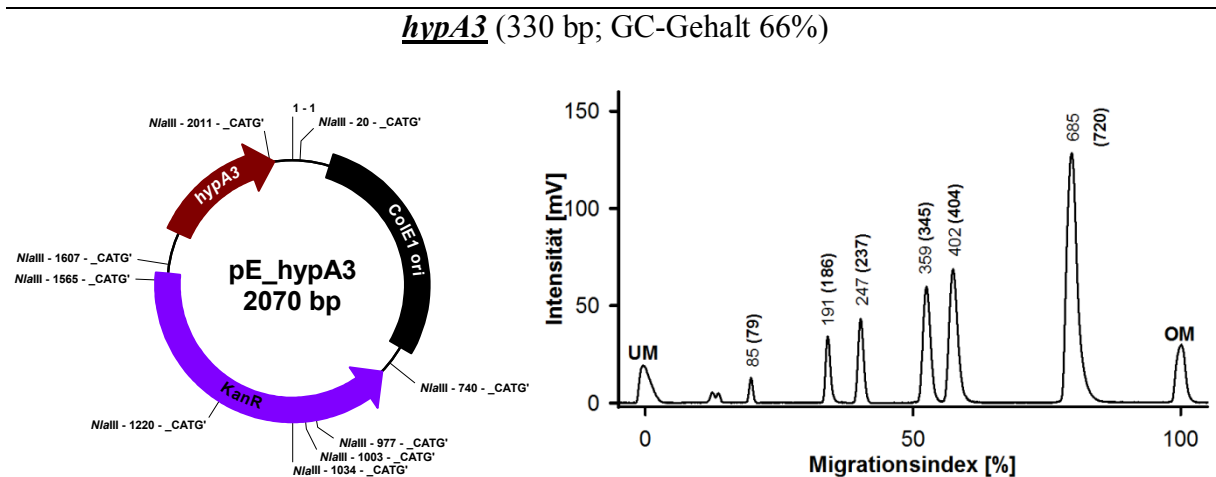


Abb. VI.33 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hypA3*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hypA3      ATGCACGAACAAAGTATCGCGAACAGCGTGGTCGAGATCTGTGCCGAGCAGGCGCGGGGC 60
hypA3_seq  ATGCACGAACAAAGTATCGCGAACAGCGTGGTCGAGATCTGTGCCGAGCAGGCGCGGGGC 60
hypA3      GCGCGCGTGTCTGGGTGCAGCTCGAGATCGGCCGCTATGTGCGGTGATGCCGGATGCT 120
hypA3_seq  GCGCGCGTGTCTGGGTGCAGCTCGAGATCGGCCGCTATGTGCGGTGATGCCGGATGCT 120
hypA3      ATCCGTTCTGCTTCGACGTGTGTGCGAAGGATACGGCGGTGGAAGCGCGGAGCTGGAG 180
hypA3_seq  ATCCGTTCTGCTTCGACGTGTGTGCGAAGGATACGGCGGTGGAAGCGCGGAGCTGGAG 180
hypA3      ATCGTGGAGACTCCCGCGTGGCGCGCTGCTTGGCTGCGCGCGGAGTTGGAGATCGCG 240
hypA3_seq  ATCGTGGAGACTCCCGCGTGGCGCGCTGCTTGGCTGCGCGCGGAGTTGGAGATCGCG 240
hypA3      GTGCGGTTCGGGAGTGC GCGTGC GCGAGCGAGAACCTGGAGTTGATCTCCGGGCGAGCAG 300

```

```

hypA3_seq      GTGCCGTTTCGGGCAGTGCCTGCGGCAGCGAGAACCTGGAGTTGATCTCCGGGCAGCAG 300
hypA3          TTGAAGATCCGGCGCATGGAGGTGGCGTGA 330
hypA3_seq      TTGAAGATCCGGCGCATGGAGGTGGCGTGA 330

```

Abb. VI.34 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypA3* mit der genom-annotierten Sequenz. hypA3 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG077; [236]); hypA3_seq = Sequenzierungsergebnis für den analysierten pF-*hypA3* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

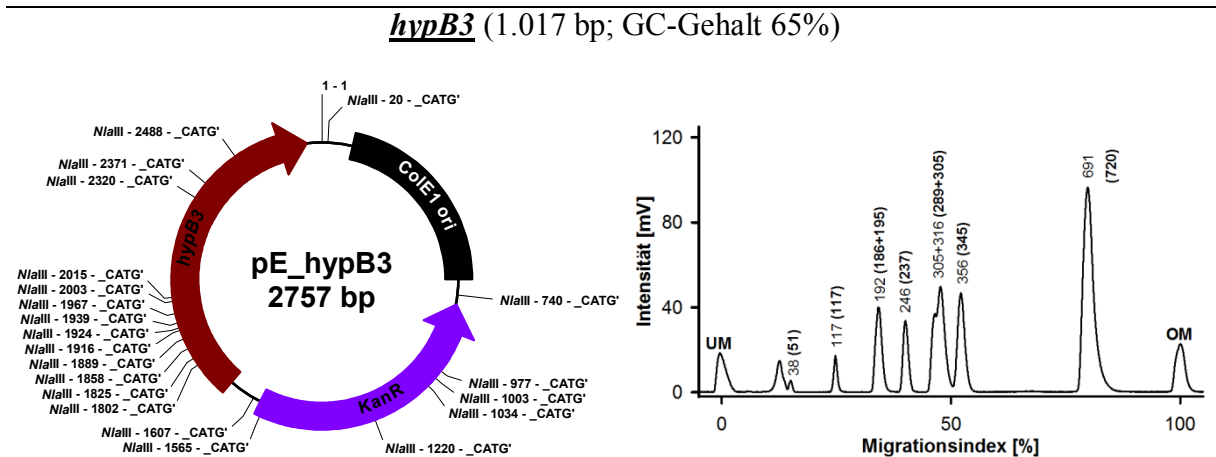


Abb. VI.35 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdau von pE-*hypB3*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hypB3      ATGTGCACGACTTGCGGTTGCGGGCAGTACGACGGGCGCAGTGGTCTCGGGCCCGGCAGCA 60
hypB3_seq  ATGTGCACGACTTGCGGTTGCGGGCAGTACGACGGGCGCAGTGGTCTCGGGCCCGGCAGCA 60
hypB3      GAAGGTGAACCGGCGCAACAGCCGCGCGGGACAGGACGTGGTGCATGCGCATCCCGTAT 120
hypB3_seq  GAAGGTGAACCGGCGCAACAGCCGCGCGGGACAGGACGTGGTGCATGCGCATCCCGTAT 120
hypB3      CCGGATGCCATGTACCCCGGGCCCGCGCAGGAGCCGCGCGCATGGTGTTCGCGCAAGCAT 180
hypB3_seq  CCGGATGCCATGTACCCCGGGCCCGCGCAGGAGCCGCGCGCATGGTGTTCGCGCAAGCAT 180
hypB3      CCCGCCGACGATCATGCCGGCCACGCGGGTGCCCTCCTGCATGCGCCCATGCATCGGCGT 240
hypB3_seq  CCCGCCGACGATCATGCCGGCCACGCGGGTGCCCTCCTGCATGCGCCCATGCATCGGCGT 240
hypB3      GCCATGCATTACCAAGACCATCCGCTCGAGCATGCGCAGCTCATTCACGAACACGCC 300
hypB3_seq  GCCATGCATTACCAAGACCATCCGCTCGAGCATGCGCAGCTCATTCACGAACACGCC 300
hypB3      CACGAACATGCTCACGAACATGCTCAGTCCAGGACCTCCGTCGTCATCGAGCAGGAC 360
hypB3_seq  CACGAACATGCTCACGAACATGCTCAGTCCAGGACCTCCGTCGTCATCGAGCAGGAC 360
hypB3      ATCCTCGCCAAGAACCAGTGGATCGCGCAGCGCAATCGCGGCTGGCTGGCGGGGCGCTCC 420
hypB3_seq  ATCCTCGCCAAGAACCAGTGGATCGCGCAGCGCAATCGCGGCTGGCTGGCGGGGCGCTCC 420
hypB3      ATTGTTGCGCTGAACCTCGTCAGTTCGCCAGGGGCGCGCAAGACCACGCTGCTGGAACGC 480
hypB3_seq  ATTGTTGCGCTGAACCTCGTCAGTTCGCCAGGGGCGCGCAAGACCACGCTGCTGGAACGC 480
hypB3      ACCATCCGCGACCTGGGCGCGACGCTGGAGTTGACGGTGATCGAAGGGGATCAGGCCACG 540
hypB3_seq  ACCATCCGCGACCTGGGCGCGACGCTGGAGTTGACGGTGATCGAAGGGGATCAGGCCACG 540
hypB3      CTGAACGACGCGCAGCGCATCCGCGCGGCGGCTGCCGTGCGATCCAGGTCAATACCGGC 600
hypB3_seq  CTGAACGACGCGCAGCGCATCCGCGCGGCGGCTGCCGTGCGATCCAGGTCAATACCGGC 600
hypB3      ACGGGCTGCCACCTGGATGCAGACATGATCTCGCGCGCGCTGACCGCTCTCGATCCGCGC 660
hypB3_seq  ACGGGCTGCCACCTGGATGCAGACATGATCTCGCGCGCGCTGACCGCTCTCGATCCGCGC 660
hypB3      CCGCATTCAGTTGTCATGATCAGAGATGTGGGCAACCTTATCTGTCGGGCCCTGTTTCGAC 720
hypB3_seq  CCGCATTCAGTTGTCATGATCAGAGATGTGGGCAACCTTATCTGTCGGGCCCTGTTTCGAC 720
hypB3      CTTGGGGAGCAGGCCAAGGTGGTATCTCTCCGTGACCGAAGGCGAAGACAAGCCGCTT 780
hypB3_seq  CTTGGGGAGCAGGCCAAGGTGGTATCTCTCCGTGACCGAAGGCGAAGACAAGCCGCTT 780
hypB3      AAGTATCCACACATGTTCCGTGCCAGCAGCTGATGCTGATGACCAAGACGACCTGCTG 840
hypB3_seq  AAGTATCCACACATGTTCCGTGCCAGCAGCTGATGCTGATGACCAAGACGACCTGCTG 840
hypB3      CCGTACGTGAGCTTCGACGTGGCAGCTGCTCGCCTGTGCGCGCCAGGTCAATCCGGAC 900
hypB3_seq  CCGTACGTGAGCTTCGACGTGGCAGCTGCTCGCCTGTGCGCGCCAGGTCAATCCGGAC 900
hypB3      ATCGGATCCTACAGGTGTCGGCGCTGTCCGGCGCGGAATGGATGACTGGTATCTCTGG 960
hypB3_seq  ATCGGATCCTACAGGTGTCGGCGCTGTCCGGCGCGGAATGGATGACTGGTATCTCTGG 960
hypB3      CTTGATACCGCTGCGCAGGGCGTATCGCGCCGCTGAGGACTCGTTTCCGGCGTGA 1017
hypB3_seq  CTTGATACCGCTGCGCAGGGCGTATCGCGCCGCTGAGGACTCGTTTCCGGCGTGA 1017

```

Abb. VI.36 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypB3* mit der genom-annotierten Sequenz. hypB3 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG078; [236]); hypB3_seq = Sequenzierungsergebnis für den analysierten pF-*hypB3* Klon. Die Sequenz enthält keine Mutationen.

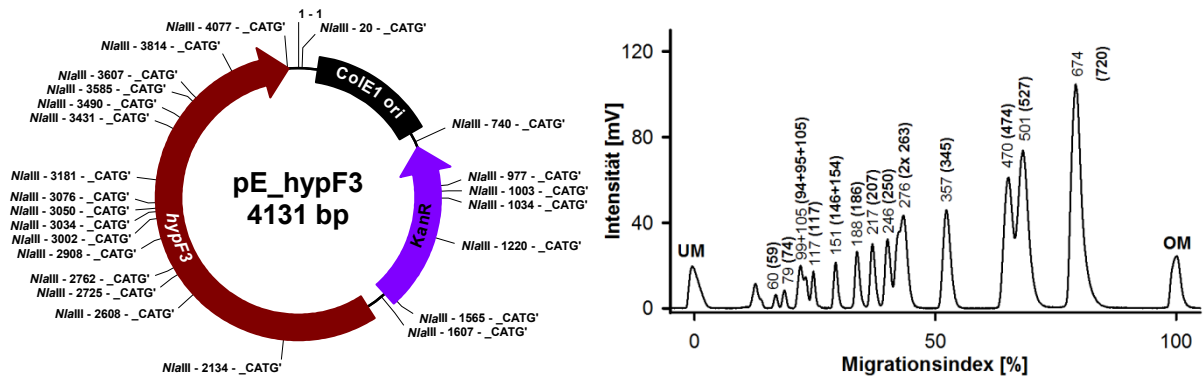
hypF3 (2.391 bp; GC-Gehalt 71%; 3 Fragmente)

Abb. VI.37 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hypF3*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

```

hypF3      ATGCGGCGCATGGTGCAGGGGGTCCGGTTCCGGCCACCGTATGGCGGCTCGCACACGAT 60
hypF3_merge ATGCGGCGCATGGTGCAGGGGGTCCGGTTCCGGCCACCGTATGGCGGCTCGCACACGAT 60
hypF3      TCGGGGCTGTCGGGCTCCGTGCGCAACGACAGCGATGGCGTGCAGATCCGCGCCTGGGGC 120
hypF3_merge TCGGGGCTGTCGGGCTCCGTGCGCAACGACAGCGATGGCGTGCAGATCCGCGCCTGGGGC 120
hypF3      GACGCCGTGGCGCTGGACCGCTTCATTGCGCGGCTGCGGGACGAGTGCCCGCCCTCGCG 180
hypF3_merge GACGCCGTGGCGCTGGACCGCTTCATTGCGCGGCTGCGGGACGAGTGCCCGCCCTCGCG 180
hypF3      CGCATCGACGCCATCGACGCCGCGCTCCTGGCGCAGGATGCCGAGGGCGCGGACCTGGGT 240
hypF3_merge CGCATCGACGCCATCGACGCCGCGCTCCTGGCGCAGGATGCCGAGGGCGCGGACCTGGGT 240
hypF3      GGCTTTCGCATTGTTGCCAGCGTGGCGGGCGCGGTGCGGACCGCGCTGGTACCGGACGCC 300
hypF3_merge GGCTTTCGCATTGTTGCCAGCGTGGCGGGCGCGGTGCGGACCGCGCTGGTACCGGACGCC 300
hypF3      GTGGTCTGTAGTGCTGCATCGCGCATATCGCGACCCGCTGAACCGCGCTATCGCTAT 360
hypF3_merge GTGGTCTGTAGTGCTGCATCGCGCATATCGCGACCCGCTGAACCGCGCTATCGCTAT 360
hypF3      CCGTTTGCCAACTGCACGCATTGCGGGCCGCGCCTGTGCGATCGTGCGCGGATTCCTTAC 420
hypF3_merge CCGTTTGCCAACTGCACGCATTGCGGGCCGCGCCTGTGCGATCGTGCGCGGATTCCTTAC 420
hypF3      GACCGCGCCAACACGGCCATGGCCGCTTCCCGATGTGCCGCGCTGCCTTGCCGAGTAT 480
hypF3_merge GACCGCGCCAACACGGCCATGGCCGCTTCCCGATGTGCCGCGCTGCCTTGCCGAGTAT 480
hypF3      GAAGACCCGGCCGACCGCGCTTCCAGCGCAGCGCTGGCGCTGCGCGGCTCGCGACCC 540
hypF3_merge GAAGACCCGGCCGACCGCGCTTCCAGCGCAGCGCTGGCGCTGCGCGGCTCGCGACCC 540
hypF3      CACGTGTGGCTCGAGCACACAGCGGGCGCTGGCGCGCGGCCAGACGACGCGATCCGC 600
hypF3_merge CACGTGTGGCTCGAGCACACAGCGGGCGCTGGCGCGCGGCCAGACGACGCGATCCGC 600
hypF3      GCGGCGTGGGCGCTCCTGCGCGACGGCGGGATCGTGCCTCAAGGGCATCGCGGGTTC 660
hypF3_merge GCGGCGTGGGCGCTCCTGCGCGACGGCGGGATCGTGCCTCAAGGGCATCGCGGGTTC 660
hypF3      CAGTTGGCTGCGATGCTGCAACCCCGTGGCGGTGGCGCGCTGCGCGACGCAAGCGG 720
hypF3_merge CAGTTGGCTGCGATGCTGCAACCCCGTGGCGGTGGCGCGCTGCGCGACGCAAGCGG 720
hypF3      CGCGAGCGCAAGCCGTTGCGACTGATGGCGCGCACCTGGCGGTGATCCGCCAATACAGC 780
hypF3_merge CGCGAGCGCAAGCCGTTGCGACTGATGGCGCGCACCTGGCGGTGATCCGCCAATACAGC 780
hypF3      GAGCCGACCGCGCGCAATGTGGGTGCTGCAAGCCCGCGCGCACCCATCGTGATCGTC 840
hypF3_merge GAGCCGACCGCGCGCAATGTGGGTGCTGCAAGCCCGCGCGCACCCATCGTGATCGTC 840
hypF3      CAGACGCGCAGCGACCGGCAAGGTGCGCCCTGGCGCGCCAGCTGCGCGCCGCGATCGCC 900
hypF3_merge CAGACGCGCAGCGACCGGCAAGGTGCGCCCTGGCGCGCCAGCTGCGCGCCGCGATCGCC 900
hypF3      GCGCTGGGGTTCATGCTGCCGGGCACACGCTGCACTGGCTGCTGATGGCGATGGCCGAC 960
hypF3_merge GCGCTGGGGTTCATGCTGCCGGGCACACGCTGCACTGGCTGCTGATGGCGATGGCCGAC 960
hypF3      CGCCCATCGTGTGCTGACGACGCGCAACGCGACGACGAGCCAGTGACGAGAGACGCC 1020
hypF3_merge CGCCCATCGTGTGCTGACGACGCGCAACGCGACGACGAGCCAGTGACGAGAGACGCC 1020
hypF3      GACGCGCGATGCGGCTCGGCGCGATCGCGGATCGGTTCCGTGATGATGACCGTGACGTC 1080
hypF3_merge GACGCGCGATGCGGCTCGGCGCGATCGCGGATCGGTTCCGTGATGATGACCGTGACGTC 1080
hypF3      GTCCGCGCGTGGATGACTCAGTCGCGCGCTGCTGCTGGACGTGCCCGGGTGTGCGG 1140
hypF3_merge GTCCGCGCGTGGATGACTCAGTCGCGCGCTGCTGCTGGACGTGCCCGGGTGTGCGG 1140
hypF3      CGCTCAGCGGATATGCGCCCGCGCGCTGCGGTTGCGCGCGGGCTTCGCTGCGCGGCG 1200
hypF3_merge CGCTCAGCGGATATGCGCCCGCGCGCTGCGGTTGCGCGCGGGCTTCGCTGCGCGGCG 1200
hypF3      CCGGTGCTGGCCATGGCGCGGAGCTCAAGAACAGTTCTGCTGATGCGCGCGGGCGAG 1260
hypF3_merge CCGGTGCTGGCCATGGCGCGGAGCTCAAGAACAGTTCTGCTGATGCGCGCGGGCGAG 1260
hypF3      GCCATCTTGTCACCATATGGCGGACCTGGAAGACGCGCTGACCCATGCCGACTACCGC 1320
hypF3_merge GCCATCTTGTCACCATATGGCGGACCTGGAAGACGCGCTGACCCATGCCGACTACCGC 1320
hypF3      CGCGCGCTGACGCAATACATGGCGTTGTTTCGAGCATGGCCGCACTGCTGCGCGGTGAC 1380
hypF3_merge CGCGCGCTGACGCAATACATGGCGTTGTTTCGAGCATGGCCGCACTGCTGCGCGGTGAC 1380
hypF3      ATGCATCCCGAATACCTGTCGCGCAAGATCGGCCGCGACCTGGCACGGCAGGGCAGCTG 1440
hypF3_merge ATGCATCCCGAATACCTGTCGCGCAAGATCGGCCGCGACCTGGCACGGCAGGGCAGCTG 1440
hypF3      CCGGTTGCGCAGGTGACGATCATCAGCGCATATCGCGCGTGCATGGCGGAGAACCGC 1500
hypF3_merge CCGGTTGCGCAGGTGACGATCATCAGCGCATATCGCGCGTGCATGGCGGAGAACCGC 1500
hypF3      GTGGCCCTGGCGCGCGCGCGCTACTGGGCGTGGCGCTGGATGGCATCGGGTACGGTGT 1560
hypF3_merge GTGGCCCTGGCGCGCGCGCGCTACTGGGCGTGGCGCTGGATGGCATCGGGTACGGTGT 1560
hypF3      GATGGCAGTCTATGGGGTGGCGAATTCTGTTGGCGGACTACCGGGACTTCACGCGGCTG 1620
hypF3_merge GATGGCAGTCTATGGGGTGGCGAATTCTGTTGGCGGACTACCGGGACTTCACGCGGCTG 1620
hypF3      GCCTGCTTCAAGCCCGTGGGGATGCCGCGCGTGAGCGCGCATCCACAGCCGTGGCGC 1680
hypF3_merge GCCTGCTTCAAGCCCGTGGGGATGCCGCGCGTGAGCGCGCATCCACAGCCGTGGCGC 1680
hypF3      AATACCTACGCACATCTGGCGCGCGGTGGGATACCTGATGCGCGCGCATGCC 1740
hypF3_merge AATACCTACGCACATCTGGCGCGCGGTGGGATACCTGATGCGCGCGCATGCC 1740
hypF3      AGCCTGGCGCTGTACGCTTCTGGCAACGCGCCGCGCGAGGTAAGGACGCGCATGCTT 1800
hypF3_merge AGCCTGGCGCTGTACGCTTCTGGCAACGCGCCGCGCGAGGTAAGGACGCGCATGCTT 1800
hypF3      ACGCGCAGCATCAACAGCCGCTGGCGAGCTCGGCCGGCGGCTGTTGATGCGGTGGCG 1860

```

hypF3_merge	ACGCGCAGCATCAACAGCCCGCTGGCCAGCTCGGCCGGGCGGCTGTTTCGATGCGGTGGCG	1860
hypF3	GCGGCCGCTGGCGCTGTCCCGAGCGGGCATGCTACGAGGGGACGCCCGCATGGAGTTC	1920
hypF3_merge	GCGGCCGCTGGCGCTGTCCCGAGCGGGCATGCTACGAGGGGACGCCCGCATGGAGTTC	1920
hypF3	GAAGCGCTGGCCGATCGCCGACGCTGAGCGAGGAAGACGATGGCCGTGCCTATCCGTTC	1980
hypF3_merge	GAAGCGCTGGCCGATCGCCGACGCTGAGCGAGGAAGACGATGGCCGTGCCTATCCGTTC	1980
hypF3	GCCATCGTGCCGGGACGCCGGCTGCCTGGAGCCGGGCCGATGTGGGTGGCCCTGCTG	2040
hypF3_merge	GCCATCGTGCCGGGACGCCGGCTGCCTGGAGCCGGGCCGATGTGGGTGGCCCTGCTG	2040
hypF3	GCTGACCTGGCGCGCTACGCCGGCGCCGCTGATCAGCGCGCGCTTCCACAAGGGGCTG	2100
hypF3_merge	GCTGACCTGGCGCGCTACGCCGGCGCCGCTGATCAGCGCGCGCTTCCACAAGGGGCTG	2100
hypF3	GCGATCGCCATCGCGAGCATGGTCGCGTACCTGGCGGACTGCCCGGGCGCGGGTCCGC	2160
hypF3_merge	GCGATCGCCATCGCGAGCATGGTCGCGTACCTGGCGGACTGCCCGGGCGCGGGTCCGC	2160
hypF3	GCGGTGCCGTGGCCCTGTCCGGCGGTGTGTTCAGAACCGCATCCTGCTCGAACAGTTC	2220
hypF3_merge	GCGGTGCCGTGGCCCTGTCCGGCGGTGTGTTCAGAACCGCATCCTGCTCGAACAGTTC	2220
hypF3	GCCACGCGGCTTTCGCGCAAGGCCGCCGCGTGTGACGACACAGCCAGGTACCCGCCAAT	2280
hypF3_merge	GCCACGCGGCTTTCGCGCAAGGCCGCCGCGTGTGACGACACAGCCAGGTACCCGCCAAT	2280
hypF3	GACGGCGGCTCTCGTTCGGGACGGCGCCATCGCCCGCGCGGTCCCTGGGAGGCGCA	2340
hypF3_merge	GACGGCGGCTCTCGTTCGGGACGGCGCCATCGCCCGCGCGGTCCCTGGGAGGCGCA	2340
hypF3	GACGTTGCAGGCGAGGCAACCGGGCTATCGGAGTACAACATGTGCCTAG	2391
hypF3_merge	GACGTTGCAGGCGAGGCAACCGGGCTATCGGAGTACAACATGTGCCTAG	2391

Abb. VI.38 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hypF3* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypF3* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG072; [236]); *hypF3_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hypF3.1*, pF-*hypF3.2* und pF-*hypF3.3* Klone. Die Sequenz enthält die vorgenommenen **Basenaustausche** zur Reduzierung des hohen 5'-GC-Gehalts (siehe Tabelle III.1). Gleichzeitig wurde ein **GTG-Startcodon** durch ATG ersetzt.

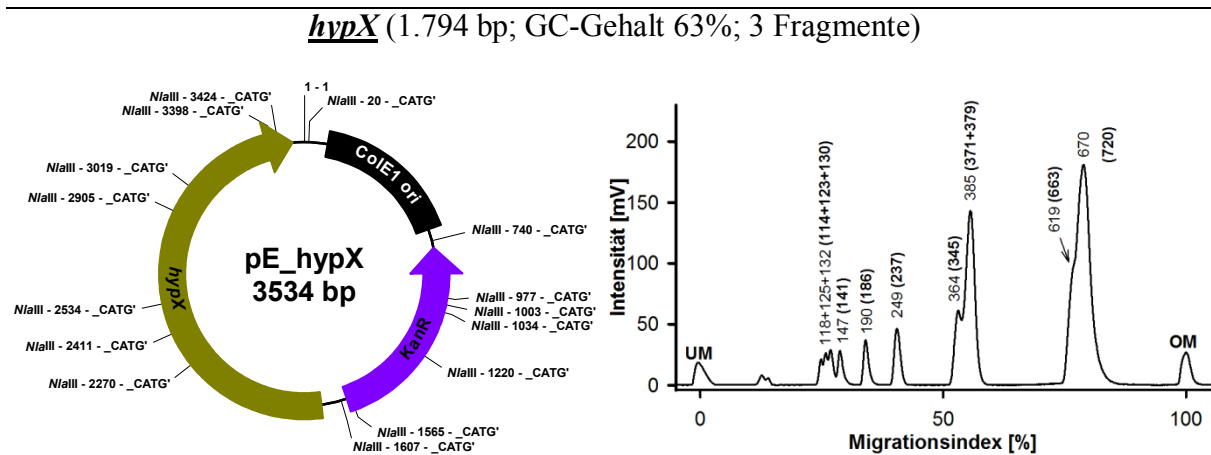


Abb. VI.39 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hypX*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hypX	ATGCGCATATTGCTCCTCACCATAGCTTCAACAGTCTGACGCAGCGACTGTTTGTGCGAG	60
hypX_merge	ATGCGCATATTGCTCCTCACCATAGCTTCAACAGTCTGACGCAGCGACTGTTTGTGCGAG	60
hypX	TTGCGCCAGCGCGCCACCTGGTGTCCGTGGAGTTCGATATTGCCGATTCCGTGACCGAG	120
hypX_merge	TTGCGCCAGCGCGCCACCTGGTGTCCGTGGAGTTCGATATTGCCGATTCCGTGACCGAG	120
hypX	GAGGCCGTGGCGCTGTTCCGCCGATCTGGTCATCGCCCTTTTCTCAAGCGTGCGATT	180
hypX_merge	GAGGCCGTGGCGCTGTTCCGCCGATCTGGTCATCGCCCTTTTCTCAAGCGTGCGATT	180
hypX	CCGGAACGAATATGGAGTGCAGTGGTCTGCTGGTGGTGCATCCTGGCATTGTCGGCGAT	240
hypX_merge	CCGGAACGAATATGGAGTGCAGTGGTCTGCTGGTGGTGCATCCTGGCATTGTCGGCGAT	240
hypX	CGCGGCCGAGTGCCTGGACTGGGCGATCGTTCTGAGCGAACGAAGTTGGGGTGTGACG	300
hypX_merge	CGCGGCCGAGTGCCTGGACTGGGCGATCGTTCTGAGATCAACGAAGTTGGGGTGTGACG	300
hypX	GTGTTGCAGGCCAACGGCGAGATGGATGCAGGTCCGGTATGGGCTAGCGCCACGTTCCCA	360
hypX_merge	GTGTTGCAGGCCAACGGCGAGATGGATGCAGGTCCGGTATGGGCTAGCGCCACGTTCCCA	360
hypX	ATGCGCGCGGCACGCAAGAGCAGCCTGTATCGTAACGAGGTGACGGTGGCAGCAGTACAA	420
hypX_merge	ATGCGCGCGGCACGCAAGAGCAGCCTGTATCGTAACGAGGTGACGGTGGCAGCAGTACAA	420
hypX	GCTGTGCTGGAGGCGCTGGCGGCTTTGAAGCCGGCTGGCGTTCGGCGAATGATGCGCAG	480
hypX_merge	GCTGTGCTGGAGGCGCTGGCGGCTTTGAAGCCGGCTGGCGTTCGGCGAATGATGCGCAG	480
hypX	AGCGGCCCGGGCACCTGGAATCCTGCAATGCGGCAGGCTGAGCGCGGCATCGACTGGGCG	540
hypX_merge	AGCGGCCCGGGCACCTGGAATCCTGCAATGCGGCAGGCTGAGCGCGGCATCGACTGGGCG	540
hypX	CGTGAGTCGACTGCCCGCTGTGGCAAAGCTACATGCGGCCGATAGCTTTCCCGGCGTA	600
hypX_merge	CGTGAGTCGACTGCCCGCTGTGGCAAAGCTACATGCGGCCGATAGCTTTCCCGGCGTA	600
hypX	CCGGATGCTTGTTCGGCCAGCCGTGCCGCTGTTTCGACGCCCCACGCCGACCCGACG	660
hypX_merge	CCGGATGCTTGTTCGGCCAGCCGTGCCGCTGTTTCGACGCCCCACGCCGACCCGACG	660
hypX	ACGGTCGACGCGCGCCGAGGCCAGCCTGGCGATATCGTTGCGCGCCGTGAGCATGCC	720
hypX_merge	ACGGTCGACGCGCGCCGAGGCCAGCCTGGCGATATCGTTGCGCGCCGTGAGCATGCC	720
hypX	GTGCTGCGCCTGACGTTGGACGAGGCGTGTGGATCGGTACGCCAAGCTGGCCGTGCGC	780
hypX_merge	GTGCTGCGCCTGACGTTGGACGAGGCGTGTGGATCGGTACGCCAAGCTGGCCGTGCGC	780
hypX	GATGAGTGGGAAACACAAGCTGCCATCTCTCAAGCTGCCGTGGCGCAAGTATTTCAT	840

hypX_merge	GATGAGTGGGAAACACAAGCCTGCCATCTCTCAAGCTGCCGGTGGCGCAAGTATTTTCAT	840
hypX	GAGGCGTGGGCGCAATTGCCGGACCTGTCTGCTGCCGCTGGAACACGACGCCGCGGAGTGG	900
hypX_merge	GAGGCGTGGGCGCAATTGCCGGACCTGTCTGCTGCCGCTGGAACACGACGCCGCGGAGTGG	900
hypX	AGCGAGTTCCGGTACTGGGAAGACGATTCCGGCGCGGGCCTGGTCGGATACTCGCCTTC	960
hypX_merge	AGCGAGTTCCGGTACTGGGAAGACGATTCCGGCGCGGGCCTGGTCGGATACTCGCCTTC	960
hypX	GACTGCTATAACGGGGCGATGTCGACCGCGCAATGCCAACGGCTTTGCGCCGCTTGC	1020
hypX_merge	GACTGCTATAACGGGGCGATGTCGACCGCGCAATGCCAACGGCTTTGCGCCGCTTGC	1020
hypX	TACGCGCGCGGTGCCAGACGCGGGTGTCTGCTGCTGGGGGAGAGGATTTTTTCAGC	1080
hypX_merge	TACGCGCGCGGTGCCAGACGCGGGTGTCTGCTGCTGGGGGAGAGGATTTTTTCAGC	1080
hypX	AATGGTATTTCATCTGCACCAATCGAGCGCGGAGCACCAGGCGCGGAGAGCGCGGCC	1140
hypX_merge	AATGGTATTTCATCTGCACCAATCGAGCGCGGAGCACCAGGCGCGGAGAGCGCGGCC	1140
hypX	GATGCTCTTGGCGCAATATTTCAGGCGATGGACGACGTCGCGCTGGAAATCCTTGCCTTT	1200
hypX_merge	GATGCTCTTGGCGCAATATTTCAGGCGATGGACGACGTCGCGCTGGAAATCCTTGCCTTT	1200
hypX	TCCGATCGCATGACGGTGTCCGCGCTGCGCGGCAATGCCGGAGCGGGCGCGCTGTTCTTG	1260
hypX_merge	TCCGATCGCATGACGGTGTCCGCGCTGCGCGGCAATGCCGGAGCGGGCGCGCTGTTCTTG	1260
hypX	GCGCTGGCGGCCGATCAGGTATGGGCGCGCAAGGTGTACTCGTGAATCCGCACTACAAG	1320
hypX_merge	GCGCTGGCGGCCGATCAGGTATGGGCGCGCAAGGTGTACTCGTGAATCCGCACTACAAG	1320
hypX	AACATGGGCAATCTGTATGGTTCGGAATACTGGACCTATCTGTTGCCGCAACGCGTCGGT	1380
hypX_merge	AACATGGGCAATCTGTATGGTTCGGAATACTGGACCTATCTGTTGCCGCAACGCGTCGGT	1380
hypX	GCGCAACGAGCCAGTGATCTGATGGACGGCGTTTGCCTATGTCGGTCCGGCGGGCGATC	1440
hypX_merge	GCGCAACGAGCCAGTGATCTGATGGACGGCGTTTGCCTATGTCGGTCCGGCGGGCGATC	1440
hypX	GAGATTGGGCTGATCGATGCCAGCTTGGACGGCGAGCGCGCTCGTGCCTTGGCGAGATT	1500
hypX_merge	GAGATTGGGCTGATCGATGCCAGCTTGGACGGCGAGCGCGCTCGTGCCTTGGCGAGATT	1500
hypX	GGCGCGCGCGCGCTTGGCTGCGCCGGCGCCAGACTATGCTGCGCATATTGACAACAAG	1560
hypX_merge	GGCGCGCGCGCGCTTGGCTGCGCCGGCGCCAGACTATGCTGCGCATATTGACAACAAG	1560
hypX	CGGCGAAAACGGGCGCGAGACGAAGCGGCAAGCCGCTGGCCAGTATCGAGAGGAAGAA	1620
hypX_merge	CGGCGAAAACGGGCGCGAGACGAAGCGGCAAGCCGCTGGCCAGTATCGAGAGGAAGAA	1620
hypX	TTGGTGCATATGCATCGGAATTCTATGGATTGATCCGAGCTATCAGTGGCACGCTAT	1680
hypX_merge	TTGGTGCATATGCATCGGAATTCTATGGATTGATCCGAGCTATCAGTGGCACGCTAT	1680
hypX	CATTTCTGTACAAATTACCCCATGCACATACGCTCGCCACCTTGCCATGCACCGGGGT	1740
hypX_merge	CATTTCTGTACAAATTACCCCATGCACATACGCTCGCCACCTTGCCATGCACCGGGGT	1740
hypX	GGCAGCTGCGCGCGCACAAAGATTGACGCGCTTGGCGGGAAACGATCTTGA	1794
hypX_merge	GGCAGCTGCGCGCGCACAAAGATTGACGCGCTTGGCGGGAAACGATCTTGA	1794

Abb. VI.40 – Nukleinsäure-Sequenzalignement für kloniertes *hypX* mit der genom-annotierten Sequenz. *hypX* = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG018; [236]); *hypX_merge* = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hypX*.1, pF-*hypX*.2 und pF-*hypX*.3 Klone. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen **Basenaustausch** zur Eliminierung der **Esp3I-Schnittstelle** (siehe Tabelle III.1).

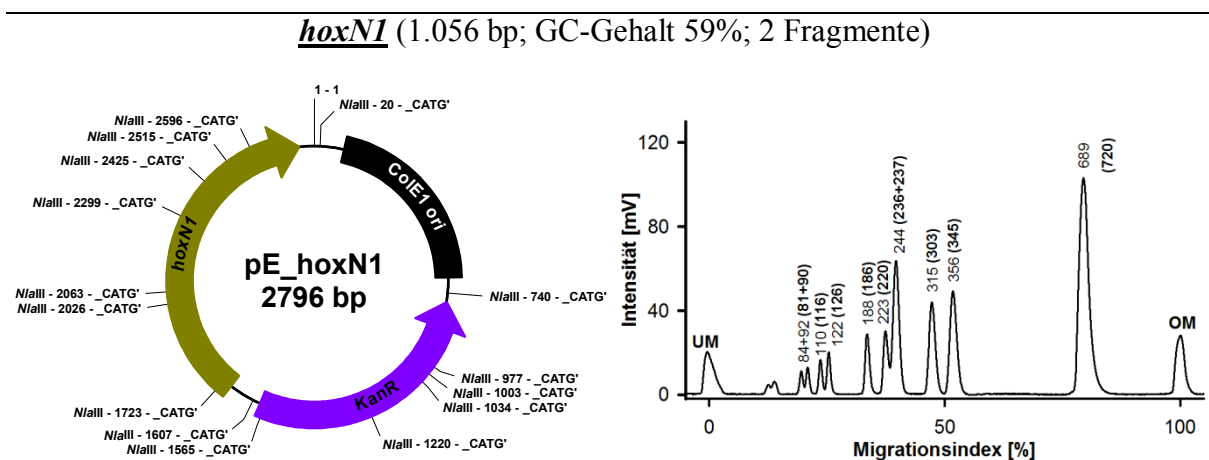


Abb. VI.41 – Vektorkarte und MultiNA-Analyse des *NlaIII*-Verdaus von pE-*hoxN1*. UM = Unterer Marker; OM = Oberer Marker; Die mittels Software erhaltenen Fragmentgrößen sind als Zahlenwerte über den Peaks dargestellt. In Klammern sind die jeweils zugehörigen, theoretischen Werte angegeben. Fragmente < 50 bp wurden nicht berücksichtigt.

hoxN1	ATGTTCCAATTGCTCGCTGGCGTACGCATGAATTCTACTGGCCGCCGCGGGCCAAGATC	60
hoxN1_merge	ATGTTCCAATTGCTCGCTGGCGTACGCATGAATTCTACTGGCCGCCGCGGGCCAAGATC	60
hoxN1	ATCTTGCTCTACGCGCTGCTGATTGCATTCAATATCGGCGCTGGCTCTGCGCGCTCGCC	120
hoxN1_merge	ATCTTGCTCTACGCGCTGCTGATTGCATTCAATATCGGCGCTGGCTCTGCGCGCTCGCC	120
hoxN1	GCGTTTCGCGATCATCCGGTGTCTGCTCGGCACCGCACTGCTGGCTACGGCTTGGGTG	180
hoxN1_merge	GCGTTTCGCGATCATCCGGTGTCTGCTCGGCACCGCACTGCTGGCTACGGCTTGGGTG	180
hoxN1	CGCCACGCGGTAGACGAGATCATCTCGCGCAATCGACAATGTACCCGCAAGTTGATG	240
hoxN1_merge	CGCCACGCGGTAGACGAGATCATCTCGCGCAATCGACAATGTACCCGCAAGTTGATG	240
hoxN1	CAGGACGCGAGCGGCCCATCACAGCTGGGCTTGGTTCTCGCTTGGCCATTCAAGTGTG	300
hoxN1_merge	CAGGACGCGAGCGGCCCATCACAGCTGGGCTTGGTTCTCGCTTGGCCATTCAAGTGTG	300
hoxN1	GTAGTGCTTGCTTCGGTGTCTGCTGTCATGGCGACACGCTCCAGGAGCGCTCGGAC	360
hoxN1_merge	GTAGTGCTTGCTTCGGTGTCTGCTGTCATGGCGACACGCTCCAGGAGCGCTCGGAC	360
hoxN1	GCGTTTCATGAAGTCGGCAGCGTTATCGGCACGCTTGCTTCCGCGCTATTTTGTTCGCC	420
hoxN1_merge	GCGTTTCATGAAGTCGGCAGCGTTATCGGCACGCTTGCTTCCGCGCTATTTTGTTCGCC	420

hoxN1	ATTGCGGCGATCAATCTGGTGATCCTGCGCTCGGCGTATCGGGCGTTCCGGCGTGTGCGG	480
hoxN1_merge	ATTGCGGCGATCAATCTGGTGATCCTGCGCTCGGCGTATCGGGCGTTCCGGCGTGTGCGG	480
hoxN1	CGCGGCGGATCTACGTTGAGGAAGACTTTGACCTTCTGTTCCGGCAACCGTGGGTTCCCTG	540
hoxN1_merge	CGCGGCGGATCTACGTTGAGGAAGACTTTGACCTTCTGTTCCGGCAACCGTGGGTTCCCTG	540
hoxN1	GCGCGTATCTCCGTCGCCCTGTTCCGGTTTCATCACACGAGTTGGCATATGTACCGGCTC	600
hoxN1_merge	GCGCGTATCTCCGTCGCCCTGTTCCGGTTTCATCACACGAGTTGGCATATGTACCGGCTC	600
hoxN1	GGCATGCTCTTTGCGCTCGGGTTCGATACCGCGACCGAGGTCGCTTGGCTCGGCATCTCG	660
hoxN1_merge	GGCATGCTCTTTGCGCTCGGGTTCGATACCGCGACCGAGGTCGCTTGGCTCGGCATCTCG	660
hoxN1	ACGATGGAGGCTTCGCGTGGCGTTCGATTGGTCGATTCTGGTATTTCGGCGCGCTGTTTC	720
hoxN1_merge	ACGATGGAGGCTTCGCGTGGCGTTCGATTGGTCGATTCTGGTATTTCGGCGCGCTGTTTC	720
hoxN1	ACCGCCGGCATGGCGCTGATCGACACCATCGATAGCATCCTGATGTGTGGCGCCTATGCG	780
hoxN1_merge	ACCGCCGGCATGGCGCTGATCGACACCATCGATAGCATCCTGATGTGTGGCGCCTATGCG	780
hoxN1	TGGGCTATGCCAAGCCCGTGGCGAAGCTCTATTACAACATGACAATTACCTTCGTATCG	840
hoxN1_merge	TGGGCTATGCCAAGCCCGTGGCGAAGCTCTATTACAACATGACAATTACCTTCGTATCG	840
hoxN1	GCGATTGTTGCCCTCATCGTCGGTGGCATTGACGCGTTGGCCCTCCTGGCCGACAAAGTTC	900
hoxN1_merge	GCGATTGTTGCCCTCATCGTCGGTGGCATTGACGCGTTGGCCCTCCTGGCCGACAAAGTTC	900
hoxN1	ATGTTGAAGGGCGTTTCTGGAACGCGGTTGGCGCTTTGAACGAGAATTCTGTCAATTG	960
hoxN1_merge	ATGTTGAAGGGCGTTTCTGGAACGCGGTTGGCGCTTTGAACGAGAATTCTGTCAATTG	960
hoxN1	GGCTTCGTCAATTATTGGCATCTTACCCTGTTGGGTCGTGTCGATCGTCGTCTATCGC	1020
hoxN1_merge	GGCTTCGTCAATTATTGGCATCTTACCCTGTTGGGTCGTGTCGATCGTCGTCTATCGC	1020
hoxN1	TTGCGCCGCTACGACGACGAGCAAGTCCGTGCCTGA	1056
hoxN1_merge	TTGCGCCGCTACGACGACGAGCAAGTCCGTGCCTGA	1056

Abb. VI.42 – Nukleinsäure-Sequenzalignment für kloniertes *hoxN1* mit der genom-annotierten Sequenz. hoxN1 = native Sequenz aus der Gendatenbank (Locus Tag PHG023; [236]); hoxN1_merge = kombiniertes Sequenzierungs-Ergebnis für die analysierten pF-*hoxN1.1* und pF-*hoxN1.2* Klone. Die Sequenz enthält keine ungewollten Mutationen, jedoch den vorgenommenen **Basenaustausch** zur Eliminierung der **Esp31-Schnittstelle** (siehe Tabelle III.1).

VI.2 Vektorkarten & Verdau zu neu synthetisierten Vektoren

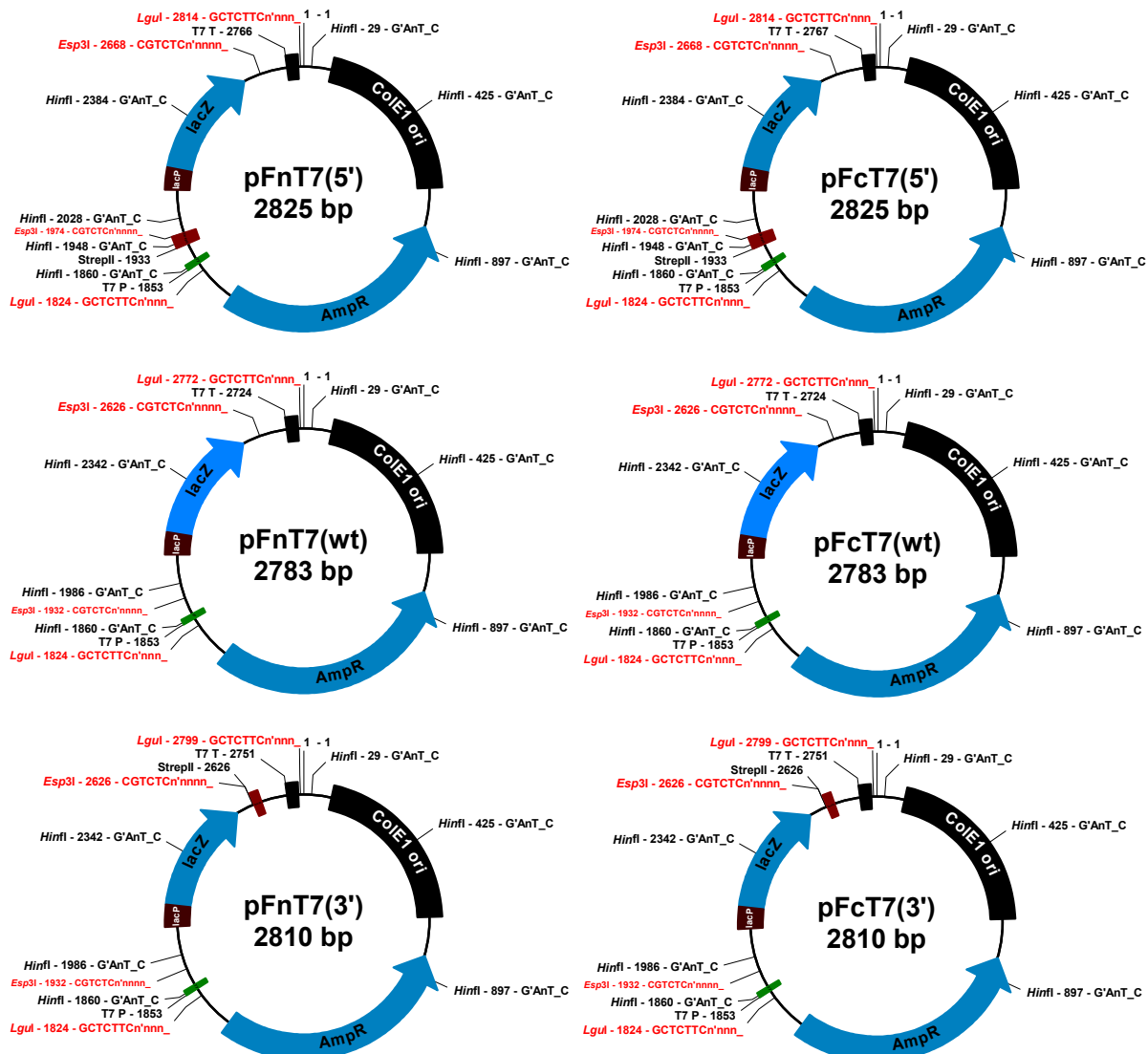


Abb. VI.43 – Vektorkarten der pFxT7-Vektorreihe (neu designte Fusionsvektoren). T7 P = T7-Promotor; T7 T = T7-Terminator; StrepII = StrepII-Tag codierende Fusionssequenz; AmpR = Ampicillin-Resistenzgen. Klonierungs- sowie Check-Verdau-relevante *LguI*-, *Esp3I*- und *HinfI*-Schnittstellen sind angegeben.

Tabelle VI.5 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HinfI*-Verdau der pFxT7-Vektorreihe.

pFxT7(5')			pFxT7(wt)			pFxT7(3')		
<i>HinfI</i> Verdau			<i>HinfI</i> Verdau			<i>HinfI</i> Verdau		
kalkuliert	gemessen		kalkuliert	gemessen		kalkuliert	gemessen	
	pFnT7(5')	pFcT7(5')		pFnT7(wt)	pFcT7(wt)		pFnT7(3')	pFcT7(3')
963	963	964	963	968	956	963	957	973
472	450	451	472	450	450	497	465	470
470			470			472	445	448
396	399	400	396	399	399	396	394	397
356	366	366	356	365	366	356	360	363
88	88	89	126	121	121	126	120	120
80	80	80						

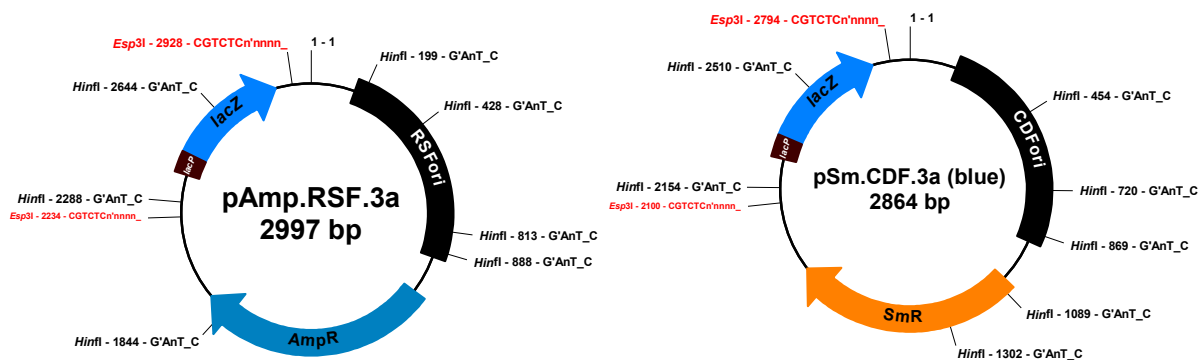


Abb. VI.44 – Vektorkarten von pAmp.RSF.3a und pSm.CDF.3a (neu designte kompatible Vektoren). AmpR = Ampicillin-Resistenzgen; SmR = Spectinomycin-Resistenzgen.

Tabelle VI.6 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HinfI*-Verdau von pAmp.RSF.3a und pSm.CDF.3a.

pAmp.RSF.3a		pSm.CDF.3a	
<i>HinfI</i> Verdau		<i>HinfI</i> Verdau	
theoretisch	gemessen	theoretisch	gemessen
956	931	852	834
676	619	808	
385	381	356	356
356	355	266	269
320	321	220	
229	221	213	215
75	77	149	147

VI.3 Vektorkarten & Verdau zu Konstrukten für die SH-Produktion

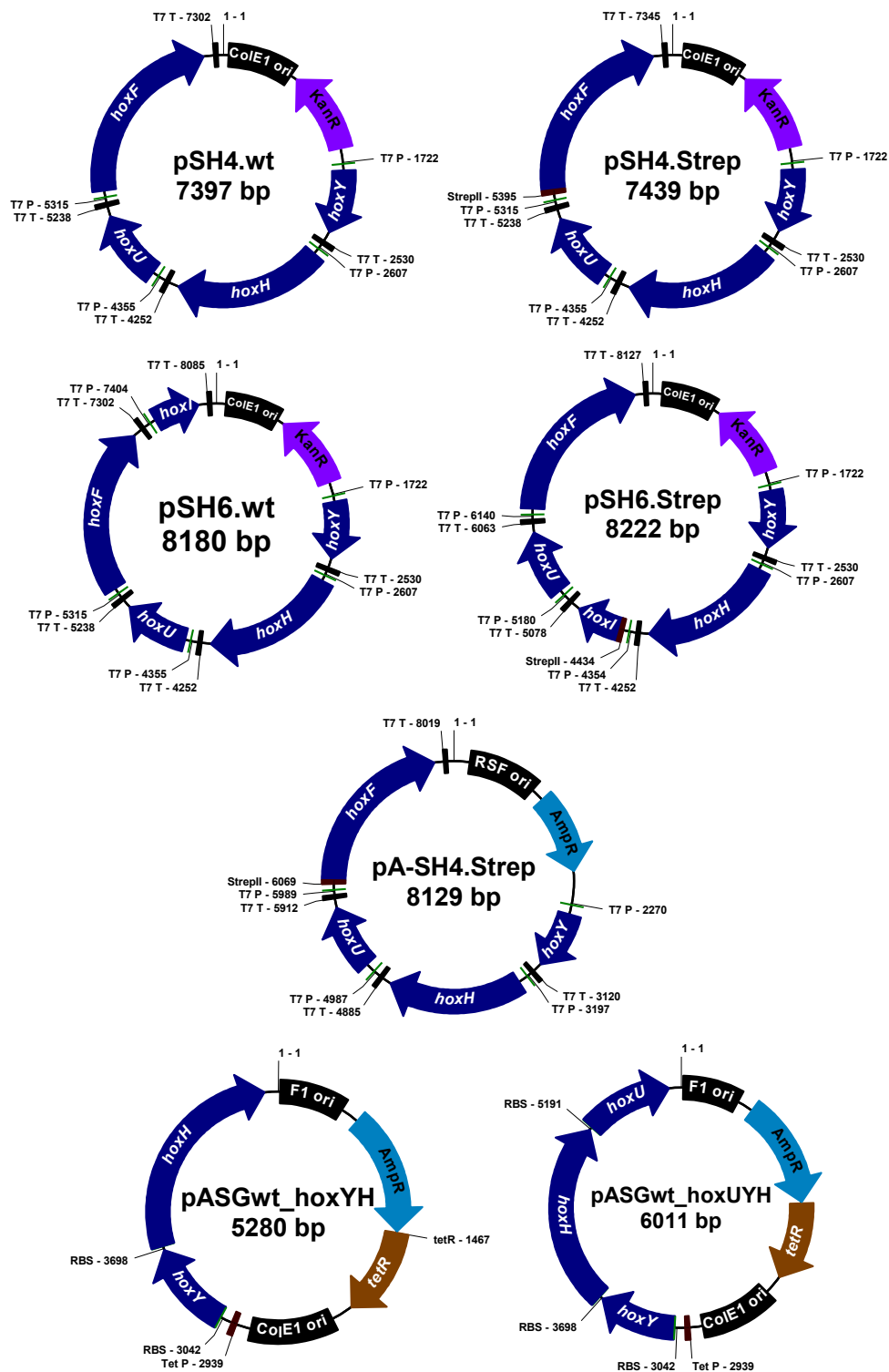


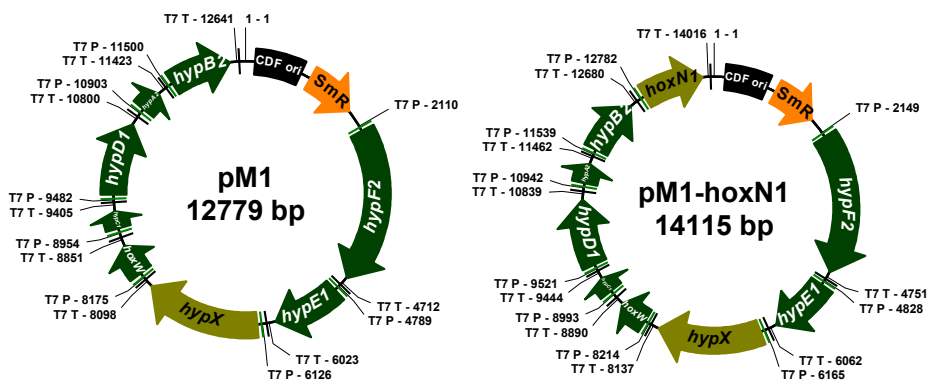
Abb. VI.45 – Vektorkarten der SH-Strukturgen-Konstrukte (finale Expressionskonstrukte). T7 P = T7-Promotor; T7 T = T7-Terminator; Tet P = Tetrazyklin-Promotor; StrepII = StrepII-Tag codierende Fusionssequenz; KanR = Kanamycin-Resistenzgen; AmpR = Ampicillin-Resistenzgen; *tetR* = Tetrazyklin-Repressor; RBS = Ribosomale Bindestelle (rbs3a). Die Restriktionsschnittstellen, welche die in den Tabellen VI.7,8 angegebenen Fragmentgrößen ergaben, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Tabelle VI.7 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *Hin*fl-Verdau von pSH4.wt, pSH6.wt, pSH4.Strep, pSH6.Strep und pA-SH4.Strep.

pSH4.wt <i>Hin</i> fl Verdau		pSH6.wt <i>Hin</i> fl Verdau		pSH4.Strep <i>Hin</i> fl Verdau		pSH6.Strep <i>Hin</i> fl Verdau		pA-SH4.Strep <i>Hin</i> fl Verdau	
kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
1339	1260	1339	1299	1339	1287	1339	1275	1339	1313
782	637	782	723	782	729	782	717	956	
590	552	760		590	543	738	680	858	918
552	502	590	549	552	508	590	545	590	547
504	481	552	512	504	480	552	507	552	524
426		527	494	426	413	504	480	409	
409	406	426	420	409		426	413	385	391
396		409		396	400	408	399	381	
381		396	406	381		396		370	
370		381		370	373	381	388	333	343
364	377	370		333	345	370		318	332
333	352	364	378	318	331	364	372	303	
288	310	333	352	288	304	333	345	288	312
173	161	288	310	173	171	288	303	229	233
165		173		165		173		173	170
134	125	165	176	134	138	165	170	165	
114	103	134	144	114	115	134	138	114	112
62	68	114	120	88	92	114	115
...

Tabelle VI.8 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *Hin*fl-Verdau von pASGwt-*hoxYH* und pASGwt-*hoxUYH*.

pASGwt- <i>hoxYH</i> <i>Hin</i> fl Verdau		pASGwt- <i>hoxUYH</i> <i>Hin</i> fl Verdau	
kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
1662	1602	1662	1609
1075	1083	1075	1099
989	1016	989	1000
801	794	801	802
588	555	744	729
143	-	575	555
		143	-



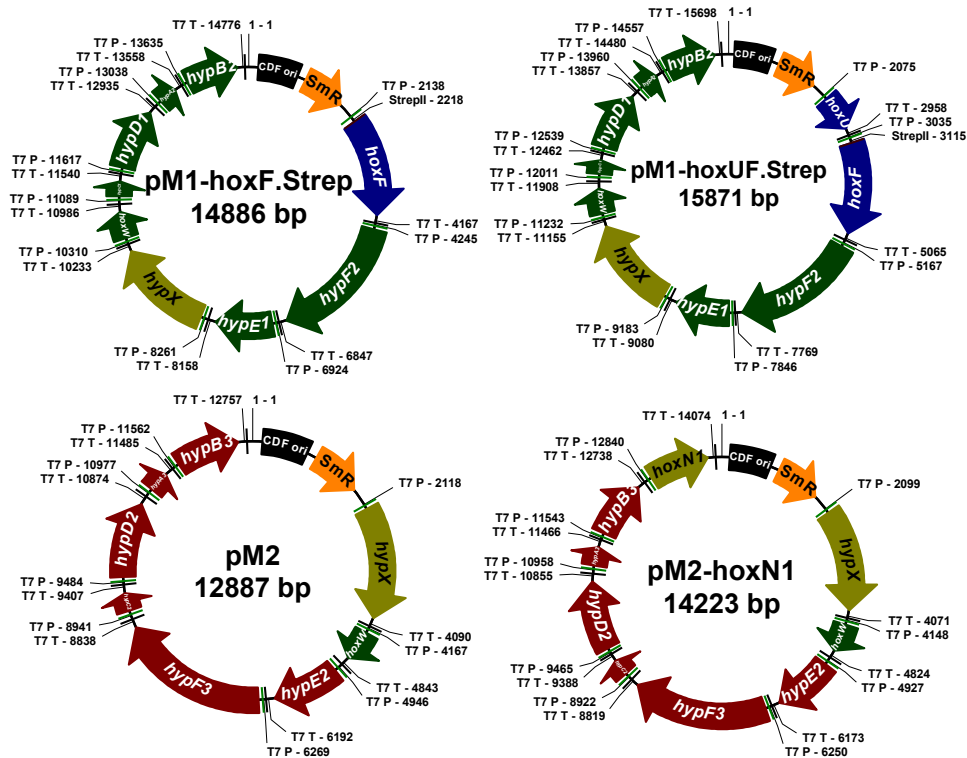


Abb. VI.46 – Vektorkarten der pM1- und pM2-Derivate (finale Expressionskonstrukte). T7 P = T7-Promotor; T7 T = T7-Terminator; StrepII = StrepII-Tag codierende Fusionssequenz; SmR = Spectinomycin-Resistenzgen; Die Restriktionsschnittstellen, welche die in den Tabellen VI.9,10 angegebenen Fragmentgrößen ergaben, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

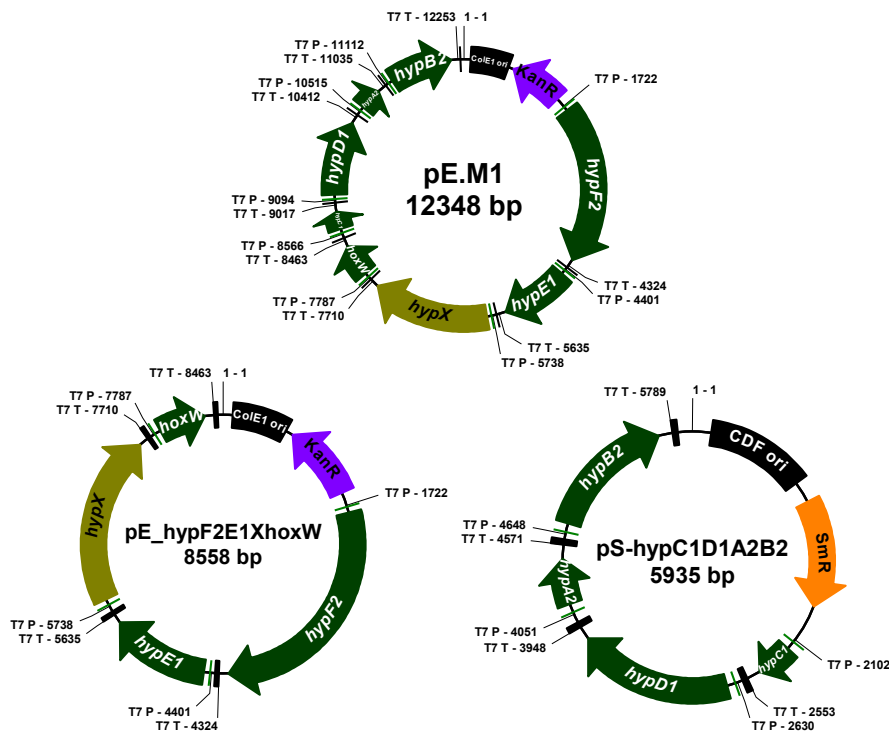


Abb. VI.47 – Vektorkarten der mit NAES-Stämmen assoziierten Konstrukte (finale Expressionskonstrukte). T7 P = T7-Promotor; T7 T = T7-Terminator; KanR = Kanamycin-Resistenzgen; SmR = Spectinomycin-Resistenzgen; Die Restriktionsschnittstellen, welche die in den Tabellen VI.9,10 angegebenen Fragmentgrößen ergaben, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

Tabelle VI.9 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HinfI*- oder *HindIII*-Verdau von pM1, pM1-*hoxN1*, pM2, pM2-*hoxN1* und pE-*hypF2E1XhoxW*.

pM1 <i>HindIII</i> Verdau		pM1- <i>hoxN1</i> <i>HinfI</i> Verdau		pM2 <i>HindIII</i> Verdau		pM2- <i>hoxN1</i> <i>HinfI</i> Verdau		pE- <i>hypF2E1XhoxW</i> <i>HinfI</i> Verdau	
kalkuliert	gemessen	theoretisch	gemessen	kalkuliert	gemessen	theoretisch	gemessen	kalkuliert	gemessen
2576	2368	1426	1369	2646	2327	1503	1446	1426	1413
2131	1995	1253		2131	1916	1323	1309	1253	
2075		1030	1164	1946		1073	1163	782	734
1395		859		1467		1030		666	609
1311	1409	835	850	1349	1461	835	803	426	408
1218		769	750	1272		769	737	396	390
753	669	666	626	753	673	685	662	381	
623	575	597	567	611	567	632	592	380	379
554	538	443	437	596		543	534	361	364
143	137	380/381/383	388	143	137	380/381/383	384	344	344
		344	354			344	351	327	
		327	337			323/327	333	320	327
		320	317			303	316	303	311
		303/304	279			266		222	224
		266/267	255			262	274	185	180
		247	244			248	256	179	171
		232	233			224/229	233	144	135
		220/221				213/220	222	134	131
		213	225			185	188	129	121
		185/187	192			179	181
		179	184			149	153		
		141/144/149	148/155			144	144		
		129	131			99	101		
			

Tabelle VI.10 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HindIII*-Verdau von pM1-*hoxF*.Strep, pM1-*hoxUF*.Strep, pE.M1 und pS-*hypC1D1A2B2*.

pM1- <i>hoxF</i> .Strep <i>HindIII</i> Verdau		pM1- <i>hoxUF</i> .Strep <i>HindIII</i> Verdau		pE.M1 <i>HindIII</i> Verdau		pS- <i>hypC1D1A2B2</i> <i>HindIII</i> Verdau	
theoretisch	gemessen	theoretisch	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
2680	2513	2705	2532	3484	3244	2131	1930
2131	1886	2131	2072	2075	2116	1395	
2075		2106		1395		1218	1291
2003		2075		1311	1498	623	558
1395	1333	1395	1465	1218		425	441
1311		1311		935	924	143	127
1218		1218		753	694		
753	826	857	899	623	588		
623	642	753	695	554	548		
554	555	623	596				
143	-	554	552				
		143	-				

VI.4 Daten zum Restriktionsverdau von Konstrukten für SH-Reifungsexperimente *in vivo*

Die Vektorkarten der Plasmide, welche in SH-Reifungsstudien eingesetzt wurden, befinden sich in Abb. III.26 (Deletions-Experimente) bzw. Abb. III.28 (Substitutions-Experimente).

Tabelle VI.11 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *Hin*I-Verdau der M1-Deletionsplasmide.

pM1 Δ <i>hypA2B2</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM1 Δ <i>hypC1D1</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM1 Δ <i>hypE1F2</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM1 Δ <i>hoxW</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM1 Δ <i>hypX</i> <i>Hin</i> I Verdau	
kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
1426	1403	1426	1373	859	905	1426	1384	1426	1387
1253		1253		847	840	1253		1253	
835	814	859	936	835	801	859	946	859	954
766		847	863	597	554	847	867	847	872
666	618	835	816	443	430	835	822	835	837
443	432	666	621	380/381/385	382	666	623	666	628
380/381/385	384	597	565	344	348	597	565	597	569
344	351	380/381/385	387	327	332	443	436	443	438
327		344	354	303/304	312	380/381	388	360	369
320	334	327		266/267	274	344	351	320	335
303	317	320	339	247	250	328		304	311
266/267	278	303	322	232	239	320	335	266/267	278
247	254	266	284	220		303/304	316	247	254
232	244	220/222	239	213	220	266/267	277	232	243
220/222	235	213	229	185/187	187	247	253	220/222	233
213	225	185	194	179	179	232	242	213	223
185/187	193	179	186	149	152	220/222		185/187	192
179	184	149	156	144		213	224	149	155
149	155	144	147	141	145	187	192	144	
144		129	132	179	182	141	147
141	147			149	154	129	131
129	131					141	148
...	...					129	130		
							

Tabelle VI.12 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *Hin*I-Verdau der M2-Deletionsplasmide.

pM2 Δ <i>hypA3B3</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM2 Δ <i>hypC2D2</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM2 Δ <i>hypE2F3</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM2 Δ <i>hoxW</i> <i>Hin</i> I Verdau		pM2 Δ <i>hypX</i> <i>Hin</i> I Verdau	
kalkuliert	gemessen	theoretisch	gemessen	kalkuliert	gemessen	theoretisch	gemessen	theoretisch	gemessen
1503	1510	1503	1488	1073	1106	1503	1543	1503	1498
1323	1362	1323	1337	847	916	1323	1381	1323	1355
847	930	1073	1185	835	796	1073	1176	1073	1180
835	811	847	966	632	584	835	821	835	813
685	666	835	832	543	509	687	735	687	730
632	595	685	679	380/381/385	382	685	680	685	672
543	537	380/381/385	389	344	348	632	606	632	600
380/381/385	387	344	353	327		543	544	543	541
344	353	327		323	330	380/381/385	394	385	397
327	338	323	336	303	314	344	359	381	389
303	318	303	319	266		328	341	360	370
266	279	266		262	273	323		323	335
248	260	262	278	248	255	303	325	266	
229	237	225		229	233	266		262	277
220		220	226	225		262	282	248	259
213	226	213		220	223	248	265	229	237
185	192	185	191	213		229	240	220	
179	183	179	184	185	189	220		213	225
149	154	149	156	179	181	213	228	185	192
144	145	144	147	149	153	179	184	149	155
99	102	99	103	144	145	149	155	144	146
...	99	101	99	102
					

Tabelle VI.13 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HindIII*-Verdau der M1-Hyp-Substitutionsplasmide.

pM1- <i>hypA3B3</i> Δ <i>hypA2B2</i> <i>HindIII</i> Verdau		pM1- <i>hypC2D2</i> Δ <i>hypC1D1</i> <i>HindIII</i> Verdau		pM1- <i>hypE2F3</i> Δ <i>hypE1F2</i> <i>HindIII</i> Verdau	
theoretisch	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
2576	2386	2576	2281	2646	2609
2131	2028	2131	1992	2131	2141
2075		2075		2075	
1395		1467		1395	1496
1311	1416	1311	1457	1220	
1272		1218		1218	1333
753	669	753	660	753	724
611	567	623	562	623	602
554	540	569	537	554	560
143	149	143	139	143	162

Tabelle VI.14 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HindIII*-Verdau der M2-Hyp-Substitutionsplasmide.

pM2- <i>hypA3B3</i> Δ <i>hypA2B2</i> <i>HindIII</i> Verdau		pM2- <i>hypC2D2</i> Δ <i>hypC1D1</i> <i>HindIII</i> Verdau		pM2- <i>hypE2F3</i> Δ <i>hypE1F2</i> <i>HindIII</i> Verdau	
theoretisch	gemessen	kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
2646	2541	2646	2523	2576	2362
2131	2085	2131	2062	2131	2075
2075		2075		2075	
1467	1538	1395		1467	
1220		1272	1438	1311	1431
1218	1344	1220		1272	
753	681	753	711	753	673
623	584	611	584	611	568
569	565	554	550	569	552
143	152	143	144	143	148

Tabelle VI.15 – Theoretische vs. mittels MultiNA gemessene Werte für den *HinfI*-Verdau der M1- und M2-HoxW/PHG070-Substitutionsplasmide.

pM1-PHG070 Δ <i>hoxW</i> <i>HinfI</i> Verdau		pM2-PHG070 Δ <i>hoxW</i> <i>HinfI</i> Verdau	
kalkuliert	gemessen	kalkuliert	gemessen
1426	1376	1503	1433
1253		1323	1345
859	945	1073	1196
847	861	835	817
835	821	687	734
666	622	685	673
597	565	632	599
443	435	543	541
426	420	426	421
406	409	406	410
380/381	388	380/381/385	391
344	352	344	357
327		327	
320	336	323	339
303/304	317	303	322
266/267	278	262/266	280
247	255	248	263
222/232	234/244	229	239
213/220	225	213/220	228
179/187	183/194	179	187
141/149	148/154	149	157
129	131	99	104
...

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater **Prof. Thorsten Selmer** für die Überlassung des spannenden Themas und seine fachliche wie auch persönliche Unterstützung danken. Seine Projektidee ebnete den Weg eines hochinteressanten Projekts, dessen Umfang zu Beginn für keinen von uns absehbar war. Viele Teilprojekte mussten deutlich über den Rahmen des ursprünglichen Antrags hin durchgesetzt werden und ich konnte mich gegenüber den Projektpartnern stets auf seine Unterstützung und Rückendeckung verlassen.

Bei **Prof. Johann Heider** bedanke ich mich herzlich für die Betreuung vonseiten der Uni Marburg. Neben der Übernahme des Gutachtens brachte Prof. Heider zahlreiche äußerst hilfreiche Anmerkungen, besonders hinsichtlich der Untersuchung des Reifungsprozesses ein.

Ein besonderer Dank gilt **Prof. Marcus Baumann**. Ihm habe ich die Rückkehr zur FH Aachen zu verdanken. Obwohl er bereits vor Beginn meiner Tätigkeit ins Rektorat berufen wurde, war er stets am Fortgang der Arbeit interessiert und fungierte besonders zu Beginn als enger Vertrauter, dessen Unterstützung mir sicher war. Vielen Dank dafür!!!

Meinem guten Freund und Kollegen **El-Hussiny Aboulnaga** danke ich für seinen nicht enden wollenden Optimismus in der ersten Projekthälfte, die zahlreichen persönlichen wie auch fachlichen Diskussionen, gemeinsame 24/7-Schichten und Kaffee-Dispute. Ich danke ebenfalls herzlich meinem guten Freund **Max Schelden**, der mich zunächst als HiWi, anschließend als Bachelor-Anwärter mehr als tatkräftig unterstützt hat. Seine persönliche wie auch fachliche Unterstützung war ebenso herausragend wie sein wissenschaftlicher Wert für das Gelingen dieses Projekts.

Verschiedenen **Kollegen und Mitarbeitern der FH Aachen** danke ich für die stets nette Arbeitsatmosphäre, darunter besonders Melanie, Brigitte, Claudia, Sandra, Vera, Simone, Thomas, Harald, Martin, Mätti, Christina, Steffen, Patrick, Markus, Niklas, Marc, Aylin, Anke und vielen Weiteren. Claudia gilt darüber hinaus ein herzlicher Dank für das wiederholte Ausleihen des Photometers. Herrn Prof. Schöning, Christina und den **INB-Mitarbeitern** danke ich für interessante Einblicke in die Welt der Biosensorik, sowie die oftmals nötige Flexibilität bei der Modifikation der im Antrag formulierten Ziele.

Ein herausragender Dank gilt **meiner Familie & Freunden**, die mich während der gesamten Studien- und Promotionszeit unterstützt und durch schwierige Phasen der Promotion begleitet haben. Mein herzlichster Dank gilt meiner Freundin **Katharina** für ihren unerschöpflichen Optimismus und ihre ständige moralische Unterstützung durch Höhen und Tiefen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

**„Heterologe Produktion und Reifung einer löslichen sauerstofftoleranten [NiFe]-
Hydrogenase aus *Cupriavidus necator* in *Escherichia coli*“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg,

Johannes Schiffels

(Datum)

(Unterschrift)

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Johannes Schiffels
Geburtsdatum	18.07.1985
Geburtsort	Aachen

Schulbildung

1992 – 1996	Katholische Grundschule Erzbergerallee, Aachen
1996 – 2005	Einhard-Gymnasium, Aachen mit Abschluss Abitur

Grundpraktikum und Studium

06/2005 – 09/2005	Praktikum am Lehrstuhl für Umweltbiologie und -chemodynamik der RWTH Aachen (bei Dipl.-Biol. G. Hommes; Prof. Dr. A. Schäffer)
2005 – 2009	Diplomstudium „Bioingenieurwesen“ an der Fachhochschule Aachen, Campus Jülich (Abschluss: Dipl.-Ing. (FH))
10/2008 – 09/2009	Praxissemester und Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME) in Aachen; Thema: „Untersuchung zur möglichen enzymkatalysierten Isomerisierung von Taxa-4(5),11(12)-dien zu Taxa-4(20),11(12)-dien innerhalb der Biosynthese von Taxol [®] “ (Betreuer: Prof. Dr. Marcus E. M. Baumann, Dr. Stefan Jennewein)

Promotion

2009 – 2013	Wiss. Mitarbeiter am Institut für Nano- und Biotechnologien der FH Aachen (INB); Projekt: „EMSiG – Entwicklung eines Multisensorsystems in Siliziumtechnik zur Beurteilung der Gärbiologie eines Anaerobfermenters in der Flüssigphase“
2010 – 2013	Kooperative Promotion an der FH Aachen, INB und der Philipps-Universität Marburg; Thema: „Heterologe Produktion und Reifung einer löslichen sauerstofftoleranten [NiFe]-Hydrogenase aus <i>Cupriavidus necator</i> in <i>Escherichia coli</i> “ (Betreuer: Prof. Dr. Thorsten Selmer, Prof. Dr. Johann Heider)